

Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung
(im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, WBex)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Ehemaliger Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

Die Bedeutung des Glykoproteins Vitronektin für die Leukozytenrekrutierung bei Ischämie-Reperfusion



DISSERTATION
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michaela Ramsauer, geb. Pörnbacher
aus Bruneck / Italien

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Christoph Andreas Reichel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Koeppel

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. rer. nat. Gabriele Zuchtriegel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2018

Eidesstattliche Versicherung

Ramsauer, geb. Pörnbacher, Michaela

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Die Bedeutung des Glykoproteins Vitronektin für die Leukozytenrekrutierung bei Ischämie-Reperfusion

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Unterschleißheim, 11.11.2017

Michaela Ramsauer

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	11
2	Einleitung	15
2.1	Entzündung	15
2.2	Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS).....	16
2.2.1	Bedeutung des IRS für die Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder	16
2.2.2	Pathophysiologie des IRS	17
2.3	Überblick Immunsystem	21
2.3.1	Zellen des angeborenen Immunsystems	21
2.3.2	Adaptives Immunsystem	25
2.4	Kaskade der Leukozytenrekrutierung.....	28
2.5	Vitronektin (VTN).....	31
2.5.1	Allgemeines zu VTN	31
2.5.2	VTN im Kontext verschiedener Krankheitsbilder	36
2.5.3	Der Stellenwert von VTN in der Pathogenese des IRS	38
3	Zielsetzung	41
4	Material und Methoden.....	43
4.1	Utensilien.....	43
4.2	Vorbemerkung	47
4.3	Versuchstiere	47
4.4	Narkose	48
4.5	<i>In-vivo</i> -Experimente	49
4.5.1	Peritonitismodell	49
4.5.2	Kremastermodell.....	53
4.6	<i>Ex-vivo</i> -Experimente	61
4.6.1	Bestimmung der Leukozytenzahl	61
4.6.2	Durchflusszytometrie	61
4.6.3	Konfokalmikroskopie.....	66

4.7	Statistik.....	69
5	Ergebnisse	71
5.1	Bedeutung von VTN für die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs.....	71
5.1.1	Analyse der Deposition von VTN auf der Oberfläche von Endothelzellen der Mikrovaskulatur.....	71
5.1.2	Einfluss von VTN auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Peritonitismodell.....	72
5.1.3	Bedeutung von VTN für die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung nach I/R des <i>M. cremaster</i>	75
5.1.4	Bedeutung von VTN für die feste Adhärenz von Thrombozyten sowie für die Interaktion/ Kokalisation von adhärenenten neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten nach I/R ...	77
5.1.5	Bedeutung von VTN und Faktoren des fibrinolytischen Systems für die Konformation von β 2-Integrinen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten	79
5.1.6	Expressionsanalyse von VTN und PAI-1 bzw. deren Komplex auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten.....	81
5.1.7	Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter	82
5.2	Bedeutung des Chemokins CCL2 für die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs.....	83
5.2.1	Einfluss von CCL2 und MAP-Kinasen auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Peritonitismodell	83
5.2.2	Bedeutung von CCL2 für die Expression und Aktivität von β 1- und β 2-Integrinen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und Monozyten	84
6	Diskussion.....	87
6.1	Steuerung der Leukozytenrekrutierung	87
6.1.1	Selektine	89
6.1.2	Integrine	89
6.1.3	Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie	93
6.1.4	Chemokine und Chemokinrezeptoren	94
6.1.5	Mitogenaktivierte Proteinkinasen.....	98
6.2	Bedeutung von VTN für die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs nach I/R	101
6.2.1	Wissenschaftliche Motivation	101
6.2.2	Endotheliale Deposition von VTN in der Mikrovaskulatur nach I/R.....	102

6.2.3	Einfluss von VTN auf die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs	104
6.3	Bedeutung des Chemokins CCL2 für die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs.....	112
7	Zusammenfassung.....	115
8	Abbildungsverzeichnis.....	119
9	Tabellenverzeichnis.....	121
10	Literaturverzeichnis	123
11	Danksagung	143

1 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	ERK1/2	<i>Extracellular-signal-regulated kinases 1/2</i>
APC	Allophycocyanin	ESAM	<i>Endothelial cell-selective adhesion molecule</i>
APCs	<i>Antigen presenting cells</i> (= antigenpräsentierende Zellen)	ESL-1	<i>E-selectin ligand-1</i>
ApoER2	Apolipoprotein E-Rezeptor-2	EZM	Extrazelluläre Matrix
Arg	Arginin	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Asp	Aspartat	fMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
ATP	Adenosintriphosphat	GAG	Glykosaminoglykane
BAL	Bronchoalveoläre Lavage	Gly	Glycin
CCL2, MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>	GlyCAM-1	<i>Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i>
CCL3, MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein-1α</i>	GP	Glykoprotein
CCL5, RANTES	<i>Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>	GPCR	<i>G-protein-coupled receptor</i>
CCL17, TARC	<i>Thymus and activation regulated chemokine</i>	GTP	Guanosintriphosphat
CCL20, LARC	<i>Liver activation regulated chemokine</i>	HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
CXCL1, GRO α	<i>Growth related oncogene-α</i>	HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
CXCL2, GRO β	<i>Growth related oncogene-β</i>	HMWK	Hochmolekulares Kininogen
CXCL8, IL-8	Interleukin-8	HSPG	Heparansulfat-Proteoglykan
CXCL12, SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i>	i.a.	Intraarteriell
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	i.p.	Intraperitoneal
Cy7	Cyanin-7	i.v.	Intravenös
Cys	Cystein	I/R	Ischämie-Reperfusion
DCs	<i>Dendritic cells</i> (= dendritische Zellen)	ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1, CD54</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	ICAM-2	<i>Intercellular adhesion molecule-2, CD102</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	IFN- γ	Interferon- γ

Ig	Immunglobulin	mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
IGF-2	<i>Insulin-like growth factor-2</i>	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
IgM	Immunglobulin M	MW	Mittelwert
IL	Interleukin	N	Neutrophile Granulozyten
iMOs	<i>Inflammatory/classical monocytes</i>	NA	Numerische Apertur
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden	NaCl	Natriumchlorid
IVM	Intravitalmikroskopie	NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
JAM	<i>Junctional adhesion molecule</i>	ncMOs	<i>Non-classical monocytes</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase	NEGF2	<i>Neurite growth-promoting factor 2, Midkine</i>
KHK	Koronare Herzerkrankung	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen-1, $\alpha_L\beta_2$-Integrin, CD11a/CD18</i>	NSTEMI	<i>Non-ST-elevation myocardial infarction</i>
LRP1	<i>Low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein-1</i>	p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
LTB4	Leukotrien B4	PAF	Plättchenaktivierender Faktor
Ly6C	<i>Lymphocyte antigen 6C</i>	PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
Ly6G	<i>Lymphocyte antigen 6G</i>	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
<i>M. cremaster</i>	<i>Musculus cremaster</i>	PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>	PE	Phycoerythrin
Mac-1	<i>Macrophage-1 antigen, $\alpha_M\beta_2$-Integrin, CD11b/CD18</i>	PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, CD31</i>
MAdCAM-1	<i>Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1</i>	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
MAP-2K	MAP-Kinase-Kinase	PMNs	<i>Polymorphonuclear neutrophils</i>
MAP-3K	MAP-Kinase-Kinase-Kinase	PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1, CD162</i>
MAP-Kinase	Mitogenaktivierte Proteinkinase	RAP, LRPAP1	<i>Receptor- bzw. LRP1-associated protein</i>
MAPK-Inhibitor	MAP-Kinase-Inhibitor	RGD	Arginin – Glycin – Aspartat
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>	RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i> der Koronargefäße
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität	RLOT	<i>Reflected light oblique transillumination</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>		

RNS	Reaktive Stickstoffspezies	uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i> , Urokinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies	uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i> , Urokinase (uPA)-Rezeptor
RT	Raumtemperatur		
SEM	<i>Standard error of mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes	<i>V. cava inf.</i>	<i>Vena cava inferior</i>
SMB	Somatomedin B	VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i> , CD106
SSC	<i>Side scatter</i>	VE-Cadherin	<i>Vascular endothelial-cadherin</i>
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor	VLA-4	<i>Very late antigen-4</i> , $\alpha_4\beta_1$ -Integrin, CD49d/CD29
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i>	VLDLR	<i>Very low density lipoprotein receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor	VTN	Vitronektin
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i> , gewebespezifischer Plasminogenaktivator	WT	Wildtyp

2 Einleitung

2.1 Entzündung

Eine Entzündungsreaktion beschreibt einen Abwehrmechanismus des Immunsystems und dient primär dem Schutz des Organismus vor gesundheitsschädigenden Faktoren. Die Art des entzündungsauslösenden Reizes bestimmt dabei wesentlich den Ablauf der Immunreaktion. In diesem Zusammenhang existiert eine Vielzahl von möglichen ätiologischen Faktoren, wie physikalische und chemische Noxen (z.B. Verletzung, Fremdkörper, Wärme, Kälte, Toxine, Strahlung, Ischämie-Reperfusion), pathogene Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Pilze, Viren, Parasiten), aber auch allergene (z.B. Pollen, Hausstaub) und körpereigene Antigene (z.B. Harnsäurekristalle, Gliadin) ^{1, 2, 3, 4}. Das klinische Erscheinungsbild einer Entzündungsreaktion ist geprägt durch die fünf Kardinalsymptome Rötung, Erwärmung, Schwellung, Schmerz und Funktionseinschränkung. Daneben können Allgemeinsymptome wie Fieber und allgemeines Krankheitsgefühl auf ein Entzündungsgeschehen hinweisen. Neben der Art des entzündungsauslösenden Faktors unterscheidet man weiter zwischen lokalen und generalisierten sowie zwischen akuten und chronischen Entzündungsreaktionen. Wesentliches Charakteristikum einer jeglichen Art von Entzündung ist die Migration von Leukozyten aus den Gefäßen der Mikrovaskulatur hin zum Ort der Gewebeschädigung oder Infektion ^{1, 2, 3, 4}.

2.2 Ischämie-Reperfusionsschaden

2.2.1 Bedeutung des Ischämie-Reperfusionsschadens für die Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder

Der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) bildet die pathophysiologische Grundlage einer Vielzahl von Krankheitsbildern. Die wohl wichtigsten Vertreter in dieser Hinsicht sind der Myokardinfarkt und der ischämische Schlaganfall ^{5, 6, 7, 8}, die bereits seit geraumer Zeit zu den häufigsten Todesursachen sowohl in Deutschland ^{9, 10, 11, 12} als auch in Europa ¹³ und weltweit ^{14, 15, 16} zählen. Ein weiteres bedeutendes und gleichzeitig relativ häufiges Krankheitsbild im Zusammenhang mit dem IRS stellt das akute Nierenversagen dar ^{17, 18, 19, 5}, das beispielsweise im Rahmen einer Sepsis oder nach akutem Niereninfarkt auftreten kann ^{17, 20, 21, 22, 23, 24, 25}. Auch viele chirurgische Eingriffe wie Herz-, Gefäß- und Bypassoperationen bergen das Risiko einer zeitweiligen Unterbrechung des Blutflusses ^{5, 6, 26, 27}. Besonders aber im Bereich der Replantations- und Transplantationschirurgie sowie in der rekonstruktiven Chirurgie ist der IRS nicht selten ein unerwünschter, oft kaum vermeidbarer Nebeneffekt mit den gefürchteten Folgen des Organversagens, der Gewebeschädigung und Entzündungsinduktion ^{5, 7, 19, 6, 26, 28, 27, 29, 30, 31, 32}. Neben den genannten relativ akuten Pathologien spielt der IRS eine wichtige Rolle in der Pathogenese diverser chronischer Krankheitsentitäten. Chronische Wunden, wie beispielsweise das Dekubitalulkus, das neuropathische Ulkus des Diabetespatienten oder das Ulcus cruris bei chronisch-venöser Insuffizienz gehen des Öfteren einher mit wiederholten Abfolgen von Ischämie und Reperfusion. Im Rahmen dieser letztgenannten Erkrankungen trägt der IRS nicht nur zur initialen Wundentstehung bei, sondern behindert gleichzeitig den Heilungsprozess ^{33, 27, 34, 35}. Darüber hinaus kommt dem IRS Bedeutung im Krankheitsprozess der Sichelzellanämie, der Schlafapnoe, dem Kreislaufstillstand, dem hämorrhagischen Schock, der Sepsis, der Verbrennungskrankheit und des Multi-

organversagens zu ^{5, 36, 27, 37, 38, 39, 40, 41}. Hinsichtlich der hohen klinischen Relevanz, der häufig schwierigen Therapierbarkeit sowie der oftmals schlechten Prognose dieser Krankheitsbilder ist ein tiefgreifendes Verständnis der dem IRS zugrundeliegenden Mechanismen von essentieller Bedeutung für die Entwicklung geeigneter Behandlungsstrategien.

2.2.2 Pathophysiologie des IRS

Die prolongierte Unterbrechung mit darauffolgender Wiederherstellung der Blutversorgung in einem Organ oder Gewebe bildet die Grundvoraussetzung für den IRS. Ischämie definiert sich als eine Minderdurchblutung von Gewebe durch mangelnde Zufuhr von arteriellem Blut ⁴². Auf zellulärer Ebene äußert sie sich in einer Diskrepanz zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf. Der Mangel an Sauerstoff führt konsekutiv zu einer Störung von sauerstoffabhängigen zellulären Vorgängen: Es kommt zum Abfall des ATP-Spiegels, zur Umstellung auf anaerobe Energiegewinnung (Glykolyse) und dadurch bedingte Akkumulation von Laktat, NAD^+ und Protonen. Die Konsequenz ist eine metabolische Azidose sowie die Veränderung der intrazellulären Ionenzusammensetzung ^{26, 6, 27, 7}. Durch Aktivierung von Ionen transportern (z.B. Na^+/H^+ -Antiporter, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter) auf der einen Seite und Ausfall von ATP-verbrauchenden Ionenpumpen (z.B. Na^+/K^+ -ATPase) auf der anderen Seite kommt es zum Kaliumverlust sowie zur intrazellulären Akkumulation von Natrium- und Kalzium-Ionen ^{27, 26, 6}. Die Kalzium-Überladung beeinflusst wiederum eine Vielzahl von zellulären Vorgängen. Unter anderem kann sie durch Aktivierung von Enzymen wie Kinasen, Proteasen, Lipasen und Endonukleasen den Zelltod herbeiführen ^{26, 43, 6, 44}.

Die Reperfusion dient in erster Linie der Wiederherstellung der Durchblutung mit erneuter Bereitstellung von Sauerstoff; ihr rechtzeitiges Einsetzen ist somit unabdingbar für das Überleben des Gewebes. Paradoxerweise verschlimmert die Reperfusion zunächst jedoch den

Gewebeschaden^{6, 26, 26}. Dies geschieht beispielsweise durch Einschwemmung von in der Ischämiephase akkumulierten toxischen Metaboliten in das reperfundierte Gewebe^{27, 7}. Die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (z.B. Hyperoxide, Peroxide wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit), die mit Zellbestandteilen wie Membranlipiden, DNA und Proteinen reagieren können, führt darüber hinaus zu einer Funktionsbeeinträchtigung der Zelle bis hin zum Zelltod (sogenanntes Sauerstoff-Paradoxon)^{26, 45, 7, 5, 17}. Radikale Sauerstoffspezies wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und begünstigen ferner die Rekrutierung von weißen Blutkörperchen indirekt, indem sie die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die Bildung von proinflammatorischen Mediatoren induzieren^{26, 46, 6, 27}. Da die Leukozyten in diesem Fall nicht der Bekämpfung von Mikroorganismen dienen, stellt der IRS eine Art der sterilen (aseptischen) Entzündung dar^{26, 5}. In Kombination mit einer Kalzium-Überladung der Zelle verursachen freie Sauerstoffspezies darüber hinaus Veränderungen in den Mitochondrien: Eine erhöhte Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran durch Öffnung von sogenannten *mitochondrial permeability transition pores* (*mPTP*) führt zum Zusammenbruch des Membranpotentials und des Protonengradienten der Mitochondrien und beeinträchtigt damit die ATP-Synthese über die Phase der Ischämie hinaus^{47, 27, 48, 5}. Des Weiteren gelangen Cytochrom C und andere proapoptotische Moleküle aus den Mitochondrien in das Zytosol wodurch die Apoptose eingeleitet wird^{47, 27, 49, 26, 5, 50}. Das *No-reflow*-Phänomen bezeichnet in diesem Zusammenhang die Verlegung von kleinen Kapillaren und postkapillären Venolen mit Ausbildung von Thromben durch Ansammlung von Leukozyten (insbesondere neutrophile Granulozyten) und Thrombozyten in der Mikrovaskulatur^{51, 27, 26, 6, 46, 52}. Die Schwellung der Endothelzellen im ischämischen Gewebe mit einhergehender Verringerung des Gefäßlumens trägt zusätzlich zu diesem Phänomen bei^{26, 53, 6, 54}.⁸ Darüber hinaus kommt es im Rahmen des Ischämie-Reperfusionprozesses zur Einschaltung des Immunsystems mit Aktivierung von Makrophagen, Degranulation von Mastzellen sowie Ablagerung von IgM-Antikörpern mit konsekutiver Aktivierung des Komplementsystems^{55, 5, 56, 27, 26}. Die vermehrte leukozytäre Produktion proinflammatorischer Zytokine und

die Freisetzung von Histamin verstärken die Entzündungsreaktion zusätzlich und führen zu erhöhter Kapillarpermeabilität mit Ausbildung eines interstitiellen Ödems^{26, 27, 57, 29}. Der Gewebeschaden bzw. Gewebeverlust bildet die gemeinsame Endstrecke dieser vielfältigen Reaktionen des Körpers als Antwort auf Ischämie-Reperfusion (I/R)^{46, 28, 57, 17, 58, 6, 53, 5, 26, 27}. Die Rekrutierung von Leukozyten in das geschädigte Gewebe besitzt dabei eine fundamentale Bedeutung in der Pathogenese des IRS. Neutrophile Granulozyten gehören zu den ersten rekrutierten Immunzellen^{57, 58, 18, 6, 27, 59}. Durch Freisetzung von Zytokinen wie z.B. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12), Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor (TNF), *monocyte chemotactic protein-1* (CCL2, MCP-1), proteolytischen Enzymen wie z.B. Elastase und Kollagenase, reaktiven Sauerstoffradikalen und Lipidmediatoren wie z.B. Leukotrien B4 (LTB4) tragen sie zunächst zur Aggravation des Gewebeschadens bei^{26, 57, 46, 58, 6, 53}. Andere Immunzellen besitzen wiederum regenerationsfördernde Funktionen, indem sie durch Phagozytose apoptotische bzw. nekrotische Zellen und Zelltrümmer beseitigen sowie die Angiogenese und Resolution der Entzündung fördern^{60, 18, 61}. In dieser Hinsicht stellt die Modulation der Rekrutierung verschiedener Leukozytensubpopulationen einen möglichen Angriffspunkt dar, um den Gewebeschaden nach I/R so gering wie möglich zu halten²⁷.

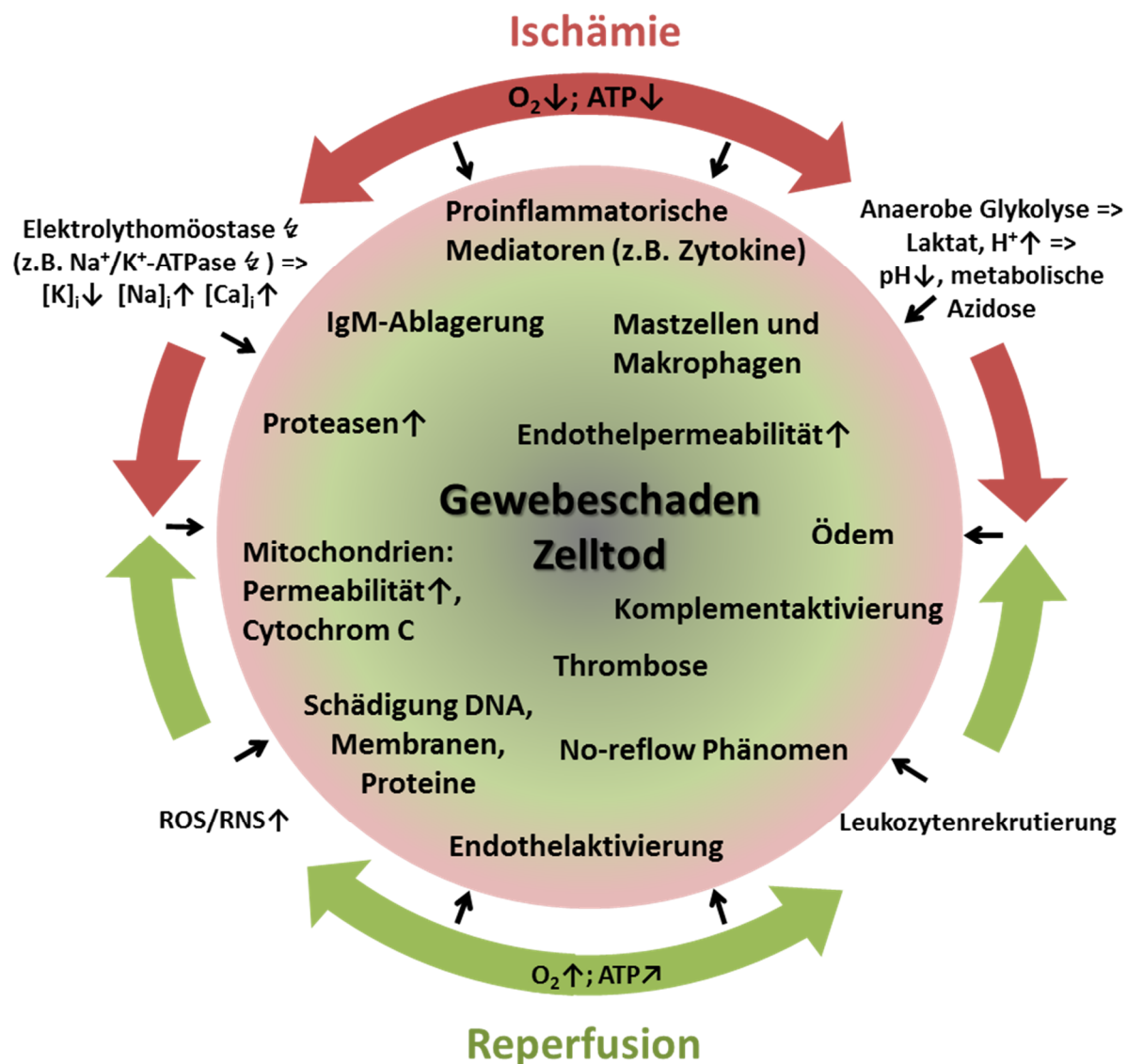


Abb. 1: Bedeutende Ereignisse in der Pathophysiologie des IRS. Der Gewebeschaden bzw. Zelltod bildet die gemeinsame Endstrecke der Abwehrmechanismen des Körpers in Reaktion auf Ischämie und nachfolgende Reperfusion. Abkürzungen: ROS/RNS (reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies).

2.3 Überblick Immunsystem

Das Immunsystem bildet die Gesamtheit aus mechanischen Barrieren des Körpers, lymphatischen Organen sowie zellulären und löslichen (sogenannten humoralen) Bestandteilen, deren gemeinsame Hauptaufgabe es ist, in den Körper eingedrungene Krankheitserreger, wie Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten und Toxine, zu beseitigen⁶². Darüber hinaus erfüllt das Immunsystem eine Reihe weiterer bedeutender Funktionen: Leukozyten, die Vertreter der zellulären Komponente des Immunsystems, sind neben der Neutralisierung von pathogenen Mikroorganismen in nahezu jede Art der Entzündung involviert und besitzen somit ebenfalls eine Schlüsselfunktion in der Genese des IRS^{57, 58, 18, 6, 27, 59, 26, 46, 53, 17, 60}. Bedeutung kommt dem Immunsystem darüber hinaus in der Beseitigung von mutierten Körperzellen zu, wodurch der Tumorentstehung vorgebeugt wird^{62, 63, 64, 65, 66, 67, 4}. Die Einteilung des Immunsystems erfolgt nach der Spezifität und der Geschwindigkeit, mit der auf eingedrungene Mikroorganismen reagiert wird. In dieser Hinsicht unterscheidet man das angeborene bzw. unspezifische vom adaptiven bzw. spezifischen Immunsystem⁶².

2.3.1 Zellen des angeborenen Immunsystems

Das angeborene (syn. unspezifische) Immunsystem dient der schnellstmöglichen und unspezifischen Beseitigung von pathogenen Mikroorganismen ohne dass ein immunologisches Gedächtnis ausgebildet wird. Neben physikalischen (z.B. Haut-Schleimhaut-Barriere, Flimmerepithel der Atemwege) und humoralen Faktoren (z.B. Lysozym der Tränenflüssigkeit und des Speichels, Defensine, Komplementsystem, Zytokine, Akute-Phase-Proteine) wird das angeborene Immunsystem durch eine Reihe von Immunzellen repräsentiert. Dazu gehören die Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen, die sich aus einer gemeinsa-

men myeloischen Vorläuferzelle im Knochenmark entwickeln sowie die natürlichen Killerzellen, die der lymphatischen Reihe entstammen ^{4, 62, 68}.

Die **neutrophilen Granulozyten** bilden zahlenmäßig die weitaus größte Gruppe der polymorphkernigen Leukozyten (PMNs), zu denen darüber hinaus die eosinophilen und basophilen Granulozyten gehören ⁴. Im menschlichen Blut repräsentieren sie mit 50 – 70 % zugleich den größten Anteil aller zirkulierenden Leukozyten ⁶⁹. Sie gehören zu den ersten Immunzellen, die im Falle eines entzündlichen Geschehens in das Gewebe auswandern ⁷⁰. Initiiert wird dieser Prozess unter anderem durch Signalmoleküle von Mikroorganismen sowie durch Chemokine und andere chemotaktische Moleküle, die von gewebsständigen Immunzellen produziert werden ⁴. Eine wesentliche Funktion der neutrophilen Granulozyten besteht in der Phagozytose von apoptotischen Zellfragmenten sowie von Krankheitserregern wie Bakterien und Pilzen ^{71, 4}. Die auf diese Weise phagozytierten Pathogene werden anschließend intrazellulär abgetötet. Zu diesem Zweck produzieren die neutrophilen Granulozyten zum einen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (sogenannter *oxidative burst*) und zum anderen diverse bakterizide Proteine, die sie in ihren zytoplasmatischen Granula speichern und durch Fusion in das Phagosom entleeren ^{69, 4, 70}. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem die Myeloperoxidase, Elastase, Proteinase 3, Cathepsin G, Gelatinase, Lysozym, Lactoferrin und Defensine ^{4, 70, 72}. Darüber hinaus können neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirkende Moleküle, wie z.B. Interleukin-8 (CXCL8, IL-8), produzieren und somit die Entzündungsreaktion verstärken ^{4, 73, 74}.

In der Pathogenese des IRS nehmen die neutrophilen Granulozyten einen besonderen Stellenwert ein ^{52, 26}. Sie wandern zu einem frühen Zeitpunkt in der Reperfusionsphase in das ischämisch-geschädigte Gewebe aus und tragen wesentlich zum Entzündungsgeschehen bei ^{57, 58, 18, 6, 27, 59, 26, 46}. Durch Sekretion von Zytokinen (z.B. IL-1/-6/-12, IFN- γ , TNF, CCL2), Myeloperoxidase, reaktiven Sauerstoffspezies, Proteasen (z.B. Elastase, Kollagenase) und Eikosanoide (z.B. LTB₄) potenzieren sie zunächst den Gewebeschaden ^{26, 57}. Des Weiteren

spielen neutrophile Granulozyten eine wesentliche Rolle in der Ausbildung des *No-reflow*-Phänomens^{52, 26}. In der Literatur wird darauf aufmerksam gemacht, dass die Depletion von neutrophilen Granulozyten sowie die Verhinderung der Rekrutierung dieser Immunzellen durch Blockade oder Defizienz von Adhäsionsmolekülen (z.B. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, Integrine) den durch I/R-bedingten Gewebeschaden verringern können^{26, 75, 76, 77, 52, 78, 79, 80, 32, 27, 58}.

Die **Monozyten** machen etwa 10 % der im Blut des Menschen zirkulierenden Leukozyten aus⁴. Durch Phagozytose und Produktion von Entzündungsmediatoren tragen sie entscheidend zur Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen bei und bilden somit eine bedeutende Säule im angeborenen Immunsystem^{4, 72}. Zu den Angriffszielen von Monozyten gehören Viren, Pilze, Protozoen und Bakterien, insbesondere auch intrazelluläre Erreger wie *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* und *Mycobacterium tuberculosis*^{4, 72, 81, 82}. Wie bei den neutrophilen Granulozyten, dient das Phagozytosepotential der Monozyten neben der Beseitigung von Mikroorganismen auch der Elimination apoptotischer Zellreste⁷².

⁴. Das Reservoir an freigesetzten Entzündungsmediatoren, Signalmolekülen und zytotoxischen Substanzen ist sehr umfangreich und umfasst unter anderem Zytokine wie TNF, Interleukine, Interferone, Chemokine wie CXCL8, CCL2, Lipidmediatoren, Wachstumshormone, Gerinnungsfaktoren, Komplementfaktoren, Enzyme wie Proteasen, Lipasen sowie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies^{72, 4}. Im Kontext einer Entzündungsreaktion unterliegen Monozyten – gleich wie neutrophile Granulozyten – einer gesteigerten Bildung im Knochenmark und wandern in zunehmendem Maß in das Gewebe aus^{72, 83, 82}. In Reaktion auf bestimmte Stimuli, z.B. Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF), differenzieren sie dort zu gewebespezifischen Makrophagen (z.B. Kupffer-Zellen der Leber, Alveolar-makrophagen der Lunge, Mesangialmakrophagen der Niere) und bestimmten Subpopulationen von dendritischen Zellen (DCs)^{84, 72, 85, 4, 86}. Über die Fähigkeit zur Antigenpräsentation können DCs, Makrophagen und Monozyten T-Zellen aktivieren und bilden auf diese Weise

eine Brücke zum adaptiven Immunsystem^{72, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 4}. Monozyten spielen ferner eine wichtige Rolle in der Pathogenese diverser Krankheitsbilder wie der Atherosklerose oder der rheumatoiden Arthritis^{4, 81}. Nach der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (human: CD14, CD16; murin: Ly6C, CCR2, CX₃CR1) werden Monozyten weiter untergliedert^{18, 84, 85, 81, 86, 93, 94, 95, 84, 96}: Die inflammatorischen (syn. klassischen) Monozyten (iMOs; murin: Ly6C^{high} CCR2⁺ CX₃CR1^{low}; human: CD14⁺⁺ CD16⁻) wandern in entzündetes oder infiziertes Gewebe aus, besitzen proinflammatorische Eigenschaften sowie die Fähigkeit zur Phagozytose^{81, 84, 97, 60, 98, 99, 85, 82, 97, 60}. Die nicht-klassischen Monozyten (ncMOs; murin: Ly6C^{low} CCR2⁻ CX₃CR1^{high}; human: CD14⁺ CD16⁺⁺) „patrouillieren“ kriechend entlang der Gefäßoberfläche in der Mikrozirkulation und können intaktes und – wenn auch weniger effizient – entzündetes Gewebe infiltrieren^{100, 81, 84, 60}. Diese Monozytensubpopulation nimmt durch ihre Fähigkeit zur schnellen Beseitigung von eingedrungenen Krankheitserregern gewissermaßen eine Wächterfunktion ein¹⁰⁰. Ferner tragen diese Immunzellen vermutlich zur Resolution eines Entzündungsgeschehens bei^{60, 81}. Der Mensch besitzt darüber hinaus noch eine dritte Monozytensubpopulation, die sogenannten intermediären Monozyten (CD14⁺⁺ CD16⁺). Funktionell unterscheidet sich diese Art der Leukozyten von den nicht-klassischen Monozyten unter anderem dadurch, dass sie eine stärkere Phagozytoseaktivität besitzt und als Antwort auf bakterielle Lipopolysaccharide TNF und IL-1 produziert^{81, 86}.

Die Bedeutung von Monozyten, Makrophagen und DCs für den IRS ist bisher nicht im Detail geklärt. Monozyten wandern nach I/R später in das Gewebe aus als neutrophile Granulozyten^{18, 60}. Eine neuere Studie geht von einem Reservoir an Monozyten in der Milz aus, das nach I/R des Myokards mobilisiert wird und das betroffene Herzmuskelgewebe infiltriert. Dort unterstützen die Monozyten vermutlich die Wundheilung^{5, 61}. Untersuchungen von Prof. Dr. Nahrendorf und Mitarbeitern geben darüber hinaus Hinweise, dass es nach einem Myokardinfarkt zu einer zeitlich versetzten Auswanderung verschiedener Monozytensubpopulationen kommt, welche durch die sich verändernde Chemokinexpression des infarzierten Myokards gesteuert wird^{60, 101}. Demzufolge kommt es in einer ersten Phase (innerhalb

drei Tage nach Myokardinfarkt) zu einer CCL2/CCR2-vermittelten Rekrutierung von inflammatorischen/klassischen Monozyten, welche durch phagozytische, porteolytische und inflammatorische Aktivität der Beseitigung des Gewebeschadens (z.B. apoptotische Zellen) dienen^{60, 101, 102, 81}. In einer zweiten Phase (zwischen vier und sieben Tage nach Myokardinfarkt) führt die veränderte Chemokinexpression zu einer CX₃CL1/CX₃CR1-vermittelten Auswanderung von nicht-klassischen Monozyten, welche durch Unterstützung der Angiogenese (Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF)), Kollagendeposition und Akkumulation von Myofibroblasten die Bildung von Granulationsgewebe begünstigen und somit wesentlich zur Wundheilung und Geweberegeneration beitragen^{60, 101}.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) dienen der Beseitigung von Tumorzellen und virusinfizierten Körperzellen, welche durch verminderte Oberflächenexpression von *major histocompatibility complex* (MHC)-Molekülen der Klasse I der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten entgehen^{4, 62}. Auch NK-Zellen spielen vermutlich eine Rolle in der Pathogenese des IRS^{58, 103, 104}.

2.3.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive, erworbene Immunsystem reagiert auf ein Entzündungsgeschehen bzw. eine Infektion mit einer gewissen Verzögerung von etwa 4 - 7 Tagen, ermöglicht jedoch eine spezifischere Erkennung von Krankheitserregern. Darüber hinaus ist das adaptive Immunsystem essentiell für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, sodass wiederholte Infektionen mit demselben Krankheitserreger dann unverzüglich bekämpft werden können. Zum adaptiven Immunsystem gehören die T- und B-Lymphozyten sowie die von Plasmazellen produzierten Immunglobuline bzw. Antikörper^{105, 4, 1}.

Die **T-Lymphozyten** entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks. Unreife T-Zellen wandern von dort in den Thymus aus, den Ort der Proliferation und Ausreifung dieser Immunzellen. Dort werden funktionslose sowie autoreaktive T-Zellen eliminiert. T-Lymphozyten erkennen mithilfe ihrer spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR) körperfremde und abnormale Antigene, die auf MHC-Molekülen von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und Körperzellen präsentiert werden ⁴. Wie bei den Monozyten umfasst auch die Gruppe der T-Lymphozyten mehrere Subpopulationen, die sich hinsichtlich ihrer Funktion und den immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen unterscheiden: Die zytotoxischen CD8⁺-T-Zellen erkennen Antigenfragmente, die über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Auf diese Weise können infizierte sowie entartete Körperzellen eliminiert werden. CD4⁺-T-Helferzellen hingegen erkennen an MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierte Antigenfragmente auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, DCs und B-Zellen. Auch Sie dienen der spezifischen Erkennung und Beseitigung von Krankheitserregern ⁴. Ferner gibt es regulatorische T-Zellen, natürliche Killer-T-Zellen sowie $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, deren genaue Funktion und Bedeutung bislang nur unzureichend verstanden ist ^{4, 106, 107, 108, 109}.

Die **B-Lymphozyten** sind Leukozyten, die ebenfalls der lymphatischen Zellreihe entstammen und im Knochenmark ausreifen. Anschließend zirkulieren sie, wie die T-Lymphozyten, zwischen Blut- und Lymphgefäßen sowie den lymphatischen Organen. Die spezifischen Rezeptoren der B-Zellen werden – im Gegensatz zu denen der T-Zellen – durch membranständige Immunglobuline repräsentiert ⁴. Als antigenpräsentierende Zellen können sie Antigene über membranständige MHC-II-Moleküle präsentieren. Durch Interaktion mit entsprechenden aktivierten T-Helferzellen proliferieren die B-Zellen und wandeln sich in Plasmazellen um, welche spezifische Antikörper gegen das Antigen produzieren und sezernieren. Demgegenüber entstehen aus einem Teil der aktivierten B-Lymphozyten sogenannte Ge-

dächtniszellen. Sie gelten als die Träger der Immunität gegenüber einmal durchgemachten Krankheiten ⁴.

Sowohl T- als auch B-Lymphozyten sind in die Pathogenese des IRS involviert. Ihr Stellenwert unterscheidet sich dabei je nach Subtyp dieser Immunzellen ^{5, 58, 26, 57, 110}. Auch hier besteht noch reichlich Forschungsbedarf, um deren Bedeutung für den genannten Krankheitsprozess genauer aufzuschlüsseln.

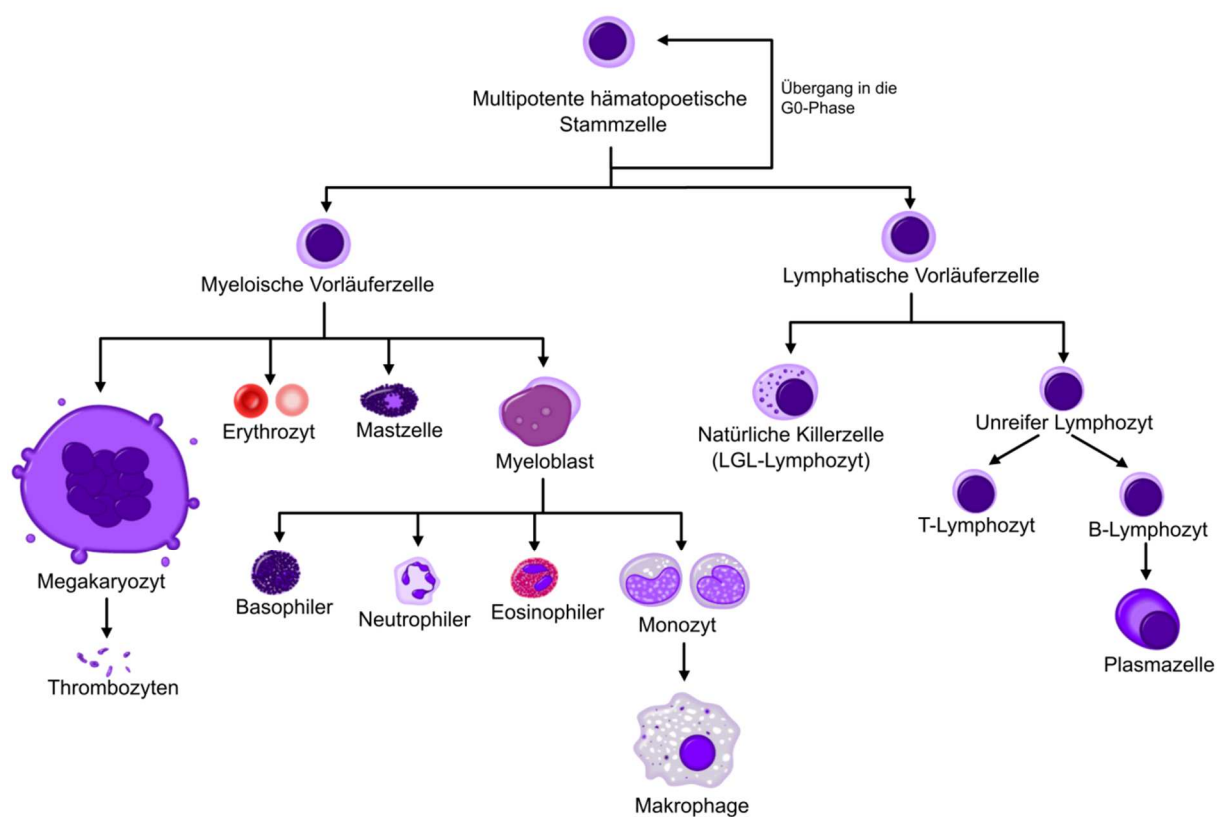


Abb. 2: Hämatopoetischer Stammbaum (nach ¹¹¹).

2.4 Kaskade der Leukozytenrekrutierung

Die Migration von Leukozyten aus dem Blutkreislauf in das Gewebe ist von grundlegender Bedeutung für eine intakte Immunantwort. Sie findet in postkapillären Venolen statt und kann in mehrere Schritte untergliedert werden, welche vorwiegend durch Interaktionen zwischen leukozytären und endothelialen Oberflächenmolekülen vermittelt werden. Nach dem initialen Kontakt mit den Endothelzellen rollen die Leukozyten an der luminalen Gefäßwand entlang. Dabei werden sie aktiviert, sie verlangsamen ihre Rollbewegung bis sie schließlich fest am Gefäßendothel adhären. Kriechend suchen sie nun die Gefäßwand nach günstigen Stellen für die Diapedese ab (sogenanntes *crawling*), wo sie schließlich transmigrieren^{112, 113} (vgl. **Abb. 3**). Dieser kaskadenartig ablaufende Prozess kann zudem unterstützt werden durch Interaktionen der Leukozyten mit Thrombozyten und weiteren Immunzellen^{114, 115, 116, 117}.

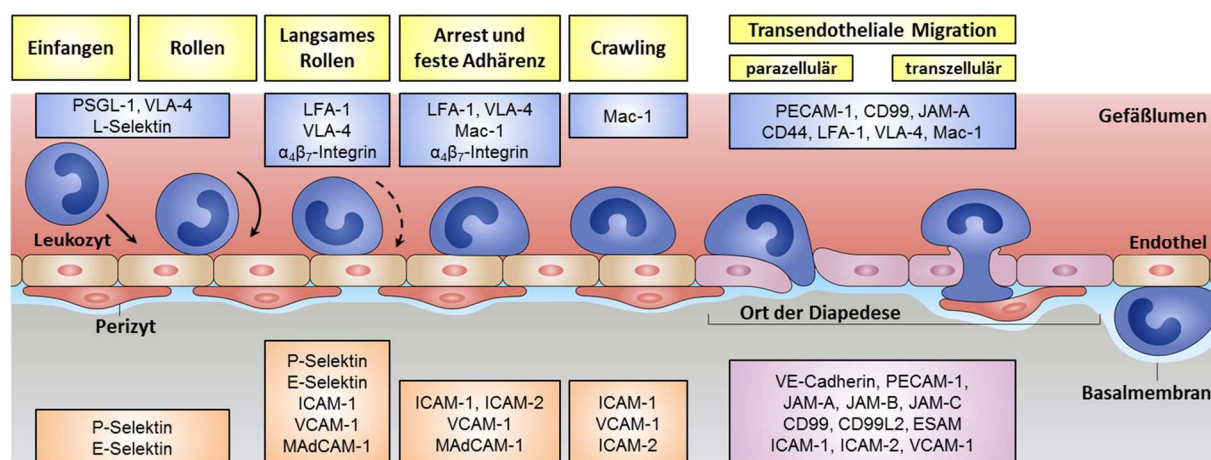


Abb. 3: Kaskade der Leukozytenrekrutierung mit Beteiligung bedeutender Oberflächenmoleküle auf Seite der Leukozyten (blau) und des Endothels postkapillärer Venolen (orange, violett) (modifiziert nach¹¹², ergänzt nach^{113, 118, 4, 119, 120}).

Durch Zytokine und andere proinflammatorische Mediatoren, die am Ort der Schädigung oder Infektion durch gewebeständige Immunzellen wie Mastzellen und Makrophagen freigesetzt werden, wird das Endothel der benachbarten Gefäße aktiviert¹¹². Es exprimiert daraufhin Adhäsionsmoleküle, die E- und P-Selektine (CD62E/P), sowie Chemokine auf ihrer Ober-

fläche^{112, 113}. Der erste Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen wird über die Interaktion von Selektinen mit ihren Liganden vermittelt^{112, 121, 122}. Durch wiederholtes Ablösen der Immunzellen vom Gefäßendothel und Bildung neuer Kontakte kommt es in der Folge zu einer Selektin-abhängigen Rollbewegung am Gefäßendothel entlang^{112, 4}. Die Interaktionen von P- und E-Selektin mit dem leukozytären Liganden *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL1, CD162) sowie die Aktivierung der Leukozyten durch endothelial präsentierte Chemokine induzieren eine Konformationsänderung der leukozytären Integrine¹¹². Auf diese Weise wird die Integrinaffinität zu den Liganden, den endothelial exprimierten Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie, erhöht und somit die Interaktion zwischen den Leukozyten und den Endothelzellen stabilisiert. Die Rollbewegung wird zunehmend abgebremst bis die Leukozyten fest am Gefäßendothel adhären^{112, 113}. Bedeutende Integrine in diesem Zusammenhang sind die β_2 -Integrine *lymphocyte function-associated antigen-1* (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$ -Integrin, CD11a/CD18) und *macrophage-1 antigen* (Mac-1, $\alpha_M\beta_2$ -Integrin, CD11b/CD18), die mit *intercellular adhesion molecules* (ICAMs) interagieren sowie das β_1 -Integrin *very late antigen-4* (VLA-4, $\alpha_4\beta_1$ -Integrin, CD49d/CD29), das an *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1, CD106) bindet^{113, 123}. Um geeignete Orte für die Transmigration aufzusuchen, verändern die Leukozyten ihre Gestalt von einer sphärischen hin zu einer abgeflachten Form (sogenanntes *spreading*) und bewegen sich kriechend entlang des Gefäßendothels fort (sogenanntes *crawling*)^{124, 113}. Dabei tasten die Immunzellen dieses mithilfe von Membranausläufern ab^{113, 124, 125, 126}. Während der Transmigration müssen die Leukozyten die drei Schichten der Gefäßwand, nämlich das Endothel, die Basalmembran und die Perizytschicht, überwinden^{112, 113}. Die Durchdringung des Endothels kann dabei entweder über den häufiger benutzten parazellulären Weg oder, seltener, transzellulär ablaufen^{113, 124, 127}. Die parazelluläre Diapedese erfordert neben der Dissoziation von Endothelzellverbindungen – in erster Linie den homophilen *vascular endothelial-cadherin* (VE-Cadherin)-Interaktionen – das Zusammenspiel verschiedener Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, wie beispielsweise *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1,

CD31), *junctional adhesion molecules* (JAMs), *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM), *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1, CD54) und *intercellular adhesion molecule-2* (ICAM-2, CD102) ^{112, 128, 129, 130, 113, 124, 131}. Nach der Durchdringung der Endothelzellschicht schließt sich das sogenannte „abluminale crawling“ an, worunter die Migration der Leukozyten durch die Basalmembran und die Schicht aus Perizyten verstanden wird ^{132, 120}. Haben die Leukozyten die Gefäßwand überwunden, wandern sie durch das Interstitium zum Ort der Entzündung, Gewebeschädigung oder Infektion. Konzentrationsgradienten aus Chemokinen und Lipidmediatoren dienen dabei als Wegweiser für die interstitielle Migration

¹²⁴.

2.5 Vitronektin

2.5.1 Allgemeines zu Vitronektin

Vitronektin (VTN) wird in der Literatur häufig als multifunktionelles Glykoprotein beschrieben^{133, 134, 135, 136}. In der Tat besitzt das Molekül eine ganze Reihe an Funktionen: Als Adhäsionsmolekül spielt es eine bedeutende Rolle für Zelladhäsions- und Migrationsprozesse und beteiligt sich in diesem Sinn auch an der Rekrutierung von Immunzellen^{134, 137, 135}. Durch Interaktion mit dem Komplementsystem greift VTN regulatorisch in Funktionen des angeborenen Immunsystems ein^{138, 136}. Darüber hinaus kann das Glykoprotein weitere (Enzym-)Kaskaden modulierend beeinflussen, wie das Gerinnungs- und das Fibrinolyse-system^{136, 135}. Nicht zuletzt ist VTN in die Pathogenese vieler Krankheitsbilder involviert¹³⁵.

2.5.1.1 Vorkommen, molekularer Aufbau und Struktur von VTN sowie Bindungsstellen

Humanes glykosyliertes VTN besitzt eine molekulare Masse von 75 bis 78 kDa und besteht aus 459 Aminosäureresten^{136, 135}. Damit stimmt es weitgehend, jedoch nicht vollständig mit murinem VTN überein (80 % Homologie)¹³⁶. Die Leber stellt den Hauptsyntheseort von VTN dar^{138, 136}. Demzufolge befindet sich der Großteil des Glykoproteins im Blutplasma. Ein kleiner Teil (ca. 1 % des Gesamt-VTN) zirkuliert als Bestandteil der α -Granula in Thrombozyten^{139, 140, 141, 142, 135}. Auch in der extrazellulären Matrix verschiedener Organe, insbesondere unter pathologischen Bedingungen, kommt VTN vor^{136, 135}. Während die VTN-Moleküle im Plasma vorwiegend (> 95 %) in monomerer Form als Einzel- oder Doppelkette vorliegen,

befindet sich in der extrazellulären Matrix sowie in Thrombozyten hauptsächlich hochmolekulares VTN in Form von VTN-Multimeren¹³⁵. Seine vielfältigen Funktionen übt VTN über Interaktionen mit den Bindungspartnern aus, welche über verschiedene Strukturdomänen des Glykoproteins vermittelt werden (siehe auch **Abb. 4**). Diese Bindedomänen sind vorwiegend an den beiden Molekülenden, dem C- und N-Terminus von VTN, konzentriert¹³⁵.

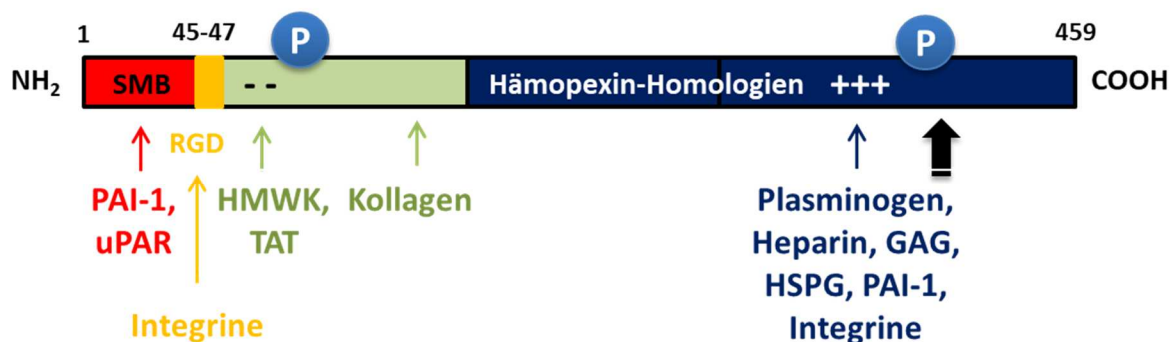


Abb. 4: Schematische Darstellung des VTN-Moleküls mit den verschiedenen Strukturdomänen und entsprechenden Interaktionspartnern; schwarzer Pfeil: Ort der endogenen Spaltung; P: (mögliche) Phosphorylierungsstellen. Abkürzungen: SMB (Somatomedin B-Domäne); RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Domäne); PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1); uPAR (Urokinase-Rezeptor); HMWK (hochmolekulares Kininogen); TAT (Thrombin-Antithrombin-Komplex); GAG (Glykosaminoglykane); HSPG (Heparansulfat-Proteoglykane) (modifiziert nach^{135, 138}).

Die Somatomedin B (SMB)-Domäne am aminoterminalen Ende ist die primäre Andockstelle für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) sowie den Urokinase-Rezeptor (uPAR)^{136, 143, 144, 145, 146, 147, 148}. Über die sich anschließende Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp), die sogenannte RGD-Domäne, wird die Interaktion mit einer Reihe von Integrinen vermittelt¹³⁶. Die durch Sulfatierung und Phosphorylierung negativ geladene Strukturdomäne des Moleküls ist Teil der Bindestelle für hochmolekulares Kininogen (HMWK) und Thrombin-Serpin-Komplexe^{135, 136}. Darüber hinaus befinden sich Andockstellen für Kollagene am N-Terminus¹³⁶. Der Großteil der VTN-Struktur (Aminosäurereste 132 - 459) enthält analoge Sequenzen zum Glykoprotein Hämapexin¹³⁶. Am Carboxy-Terminus befinden sich Andockstellen für Plasminogen, Heparin und Glykosaminoglykane

(GAG), Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) sowie die zweite Bindestelle für PAI-1 und Integrine^{149, 150, 145, 135}. Der Konformationszustand sowie der strukturelle Aufbau (z.B. Multimerisierung) von VTN beeinflussen die Interaktion mit den verschiedenen Bindungspartnern sowie konsekutiv die daraus resultierenden funktionellen Eigenschaften¹³⁵. Wie bereits erwähnt liegt VTN im Plasma überwiegend als Einzel- oder Doppelkette vor. Die Doppelkette entsteht durch endogene Spaltung eines VTN-Monomers und Verknüpfung der daraus entstandenen Proteinketten (65 kDa und 10 - 12 kDa) über eine Disulfidbrücke (Cys 274 – Cys 453)^{135, 136}. Das native, sogenannte Plasma-VTN, besitzt eine geringere Interaktionsbereitschaft mit einigen Bindungspartnern und wird deshalb als eine Art Vorläufermolekül betrachtet¹³⁵. Das hochmolekulare VTN entsteht durch Konformationsänderung und damit einhergehender Multimerisierung der Moleküle und kommt dagegen hauptsächlich in Thrombozyten sowie in der extrazellulären Matrix (EZM) vor^{151, 140, 152, 139}. Eine Konformationsänderung/Multimerisierung von VTN kann induziert werden durch Bindung einiger Liganden, wie PAI-1, Heparin oder des Thrombin-Antithrombin-Komplexes^{153, 154, 155}, sowie durch Kontakt mit Oberflächen, wie Fibrin und Strukturen der EZM, etwa im Rahmen diverser Arten von Gewebeschädigungen^{135, 156, 157}. Dieses VTN besitzt eine veränderte, denaturierte Konformation, in der vorher verborgene Epitope, wie beispielsweise die Heparin-Bindestelle, exponiert werden¹³⁵. Aus diesem Grund unterscheidet sich hochmolekulares VTN auch funktionell vom Plasma-VTN. VTN-Multimere werden von einigen Interaktionspartnern, unter anderem von PAI-1, uPAR, Integrinen, Kollagenen, Heparin und GAG, bevorzugt gebunden^{136, 138,}

158, 159, 153, 135, 137, 160, 153, 142, 161, 162, 163, 164, 165.

2.5.1.2 Funktionelle Bedeutung von VTN durch Interaktion mit seinen Bindungspartnern

Wie bereits erwähnt kann VTN eine Vielzahl an Funktionen ausüben. Durch Interaktion mit Integrinen auf der Oberfläche von Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen aber auch Tumorzellen ist VTN an der Ausbildung von Zellkontakten sowie an Migrationsprozessen, unter anderem von Leukozyten, beteiligt^{135, 136, 137, 166}. In diesem Zusammenhang wurde eine Reihe von Integrinen als Bindungspartner von VTN beschrieben, zu denen die $\alpha_v\beta_3$ -, $\alpha_v\beta_5$ -, $\alpha_v\beta_6$ -, $\alpha_v\beta_8$ -, $\alpha_{IIb}\beta_3$ - (GPIIb/IIIa), $\alpha_M\beta_2$ - (Mac-1) und $\alpha_8\beta_1$ -Integrine zählen^{167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 152, 135, 174, 137, 136, 138}. Die Bindung des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins, des sogenannten VTN-Rezeptors, kann neben der RGD-Domäne auch über die Heparin-bindende Domäne von VTN vermittelt werden^{135, 175}. Die Interaktion mit dem $\alpha_M\beta_2$ -Integrin (Mac-1), das vorwiegend auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird und an deren Adhäsion und Extravasation mitwirkt, ist unabhängig von der RGD-Sequenz^{135, 137}. Durch Interaktion mit weiteren Bindungspartnern kann VTN an mehreren Stellen modulierend in das fibrinolytische System eingreifen und gleichzeitig die nicht-fibrinolytischen Eigenschaften (z.B. perizelluläre Proteolyse, Zelladhäsion) derselben Faktoren beeinflussen. In diesem Zusammenhang sind die Interaktionen von VTN mit Plasminogen, PAI-1 und uPAR von Bedeutung^{144, 135, 176, 177}. In Verbindung mit uPAR ist VTN ebenfalls in Zellmigrations- und Signaltransduktionsprozesse involviert^{178, 135}. Bedeutung für die Zellmigration besitzt diese Interaktion vor allem durch die Fähigkeit zur Ausbildung zellulärer Kontakte, also der Adhäsion von Zellen an Oberflächen^{135, 135, 178, 179}. Andererseits führt die Bindung von (gelösten) VTN-Multimeren an endothelial präsentierten uPAR zur Aufnahme von VTN in die Zelle (Internalisierung)^{135, 148}. Im Gegensatz dazu werden PAI-1 in Verbindung mit VTN meist antiadhäsive Eigenschaften zugeschrieben. Dies beruht darauf, dass der Inhibitor mit uPAR und Integrinen (durch die enge Nachbarschaft der Somatomedin B- zur RGD-Domäne) um die Bindestellen im VTN-Molekül konkurriert bzw. die anderen Liganden verdrängt^{135, 180, 181}. In diesem Sinn herrscht in der Literatur die weit-

verbreitete Meinung, dass PAI-1 in Verbindung mit VTN die Ablösung von adhärenenten Zellen vermittelt^{147, 180, 181, 135}. Zellmigrationsprozesse können demnach durch ein komplexes Zusammenspiel von VTN mit uPAR (Zelladhäsion) sowie PAI-1 (Zellablösung) entstehen^{147, 180, 181, 135}. Die aktive Form von PAI-1 ist darüber hinaus in der Lage, die Aktivität der beiden Plasminogen-Aktivatoren *tissue-type plasminogen activator* (tPA) und *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) zu inhibieren. Eine der Hauptaufgaben von VTN besteht darin, die aktive Form von PAI-1 zu stabilisieren und somit seine äußerst kurze Halbwertszeit von nur wenigen Minuten zu verlängern. Auf diese Weise können PAI-1 und VTN eine überschießende Fibrinolyse verhindern bzw. den proteolytischen Abbau der extrazellulären Matrix steuern^{136, 182, 183, 135}. Die beschriebenen Mechanismen scheinen insbesondere für Wundheilung und Geweberegeneration bedeutend zu sein^{135, 181}. Im Rahmen der primären (zellulären) Hämostase wird VTN aus den α -Granula der aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet^{140, 135, 181}. Diese VTN-Multimere (nicht jedoch VTN-Monomere aus dem Plasma) werden wiederum auf der Oberfläche der Thrombozyten gebunden und sind sowohl direkt - über Interaktion mit Fibrin und $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine auf Thrombozyten - als auch indirekt - über die Stabilisierung von PAI-1 - an der Bildung und Festigung von Blutgerinnseln beteiligt¹³⁵. Einfluss auf das Gerinnungssystem übt VTN weiterhin durch Interaktion mit Heparin und dem Thrombin-Antithrombin-Komplex aus^{136, 135}. Die Funktion von Heparin, nämlich die etwa 1000-fache Wirkungsverstärkung der Antithrombin-vermittelten Hemmung von Gerinnungsfaktoren, wird durch die Interaktion mit VTN aufgehoben^{136, 135}. Insgesamt besitzt hochmolekulares VTN somit prokoagulatorische Eigenschaften¹³⁵. In Verbindung mit anderen Mitgliedern der Serpine (z.B. PAI-2, PAI-4) und Wachstumsfaktoren (z.B. *insulin-like growth factor-2* (IGF-2), *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1)) greift VTN ebenfalls in Mechanismen der Wundheilung/Geweberegeneration ein und steuert in diesem Zusammenhang die Zellproliferation, Zelladhäsion und -migration¹³⁵. Darüber hinaus besitzt das Glykoprotein weitere Interaktionspartner, unter anderem Kollagene, Komplementfaktoren, hochmolekulares Kininogen, und zeigt somit eine breite Palette an zusätzlichen Funktionen¹³⁵. Als letztes

Beispiel soll die Anlagerung von VTN an den C5b-C7-Komplex des Komplementsystems genannt werden, wodurch die Lyse von Zielzellen des Membranangriffskomplexes verhindert werden kann^{166, 138, 136}. Neben der Unterstützung der Leukozytenrekrutierung greift VTN somit auch auf diese Weise in Funktionen des angeborenen Immunsystems ein.

2.5.2 VTN im Kontext verschiedener Krankheitsbilder

Im Plasma liegt VTN in einer Konzentration von 200 - 400 µg/ml vor und macht 0,2 - 0,5 % der gesamten Plasmaproteine aus^{184, 185, 186, 187, 138}. Die Leber stellt den Hauptsyntheseort von VTN dar. Bei Patienten mit schwerem Leberversagen wurden verminderte Plasma-Spiegel beobachtet, wobei die Schwere der Erkrankung negativ mit dem VTN-Spiegel korrelierte^{187, 188, 189}. Erhöhte Plasma-Spiegel von VTN wurden hingegen bei Patienten nach orthopädischen Operationen und bei Nagetieren im Rahmen akuter systemischer Entzündungsreaktionen festgestellt^{190, 191, 138}. Mithilfe von *In-vivo*-Experimenten in der Maus und Ratte konnte nach Induktion einer systemischen Entzündung (z.B. durch intraperitoneale Endotoxininjektion) eine Zunahme der VTN-mRNA-Konzentration in der Leber detektiert werden, nicht jedoch in anderen Geweben^{191, 190}. Diese Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass die Synthese von VTN in der Leber ähnlich den Akute-Phase-Proteinen entzündungsabhängig gesteigert wird^{138, 191}. Neben den genannten Lokalisationen (Plasma, Thrombozyten, EZM) kommt VTN in diversen Körperflüssigkeiten, wie in der Samenflüssigkeit, im Urin, Fruchtwasser, Liquor, sowie in der bronchoalveolären Lavage (BAL) vor^{185, 192, 193, 194, 135, 195}. Bei Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen, wie z.B. Sarkoidose und Lungenfibrose, konnte eine fast 10-fach erhöhte VTN-Konzentration in der BAL detektiert werden^{192, 193, 194}.

Unter normalen Bedingungen liegt VTN in einigen Geweben des Menschen (z.B. EZM der Haut, Knochen, Retina, Gefäßwand) in geringer Konzentration vor ^{196, 197, 198, 138, 199, 135, 200}. Unter pathologischen Zuständen kann die VTN-Konzentration im Gewebe jedoch deutlich ansteigen. Atherosklerotische Plaques, akuter Myokard- und Niereninfarkt stellen Beispiele für Lokalisationen bzw. Situationen vermehrter VTN-Ablagerungen dar ^{201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 195, 135}. Häufig werden verstärkte VTN-Ablagerungen in fibrosierten, sklerosierten und nekrotischen Gewebeveränderungen nachgewiesen ^{138, 135}, wie beispielsweise bei Erkrankungen der Leber und Gallenwege (chronische Virushepatitis, Leberzirrhose, fokale Leberzellnekrose, primär sklerosierende Cholangitis), bei degenerativen Erkrankungen der Haut, des zentralen Nervensystems (z.B. Alzheimer-Krankheit) und der Retina (z.B. altersbedingte Makuladegeneration) ^{208, 138, 209, 189, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 195, 135}. Das Glykoprotein VTN kann dabei als eine Art Marker für Gewebeschädigung/-regeneration angesehen werden ^{135, 138}. Die Bedeutung bzw. Funktion von VTN in der Pathogenese dieser Krankheitsbilder ist noch nicht im Detail aufgeschlüsselt, eine Einflussnahme auf die provisorische Wundheilung und Geweberegeneration wird jedoch angenommen ¹³⁵. In diesem Sinn wäre es vorstellbar, dass VTN als Transportmittel für andere Moleküle fungiert, die für die Wundheilung benötigt werden ¹³⁸. Die Rekrutierung von PAI-1 in das geschädigte Gewebe könnte beispielsweise einer überschießenden Fibrinolyse entgegenwirken ¹³⁸. Andererseits gehen langfristig erhöhte VTN-Konzentrationen jedoch mit chronischen Gewebeschädigungen und vermehrter Fibrose einher ^{217, 209}.

In Verbindung mit einigen Interaktionspartnern (z.B. uPAR, Integrine) scheint VTN ferner Bedeutung für die Progression und Metastasierung bösartiger Tumoren sowie deren Angiogenese zu haben ¹³⁵. Eine Reihe von Malignomen, darunter gynäkologische Tumoren wie Zervix- oder Ovarialkarzinom, besitzt darüber hinaus die Fähigkeit, VTN zu synthetisieren ^{135, 138, 218, 219}. Ein Zusammenhang zwischen VTN und der Malignität und Prognose dieser Tumorentitäten wird vermutet ^{138, 136}. In Hinblick auf die genannten Krankheiten und Tumoren

könnten detailliertere Erkenntnisse über die Funktion und Regulation des Glykoproteins VTN der Entwicklung spezifischer Therapieansätze dienen.

2.5.3 Der Stellenwert von VTN in der Pathogenese des IRS

Die Rolle von VTN für die Pathogenese des IRS im Allgemeinen ist bisher nur unzureichend erforscht. Wie bereits im vorangehenden Kapitel erwähnt, können bei vaskulären Erkrankungen, wie nach akutem Myokard- und Niereninfarkt, vermehrt VTN-Ablagerungen im entsprechenden Gewebe detektiert werden ^{204, 203, 135}. Es wird vermutet, dass VTN dabei durch Rezeptor-vermittelte Transportmechanismen (z.B. Endo- und Transzytose) in das extravasculäre Gewebe gelangt ^{135, 195}. Des Weiteren konnten bei Patienten mit koronarer Herzkrankung (KHK) erhöhte Plasma-VTN-Spiegel festgestellt werden, wobei die Höhe der VTN-Konzentration mit der Schwere der Erkrankung korrelierte ²²⁰. In einer Studie zur prognostischen Relevanz des VTN-Spiegels nach stattgehabtem akutem Myokardinfarkt wurden im Serum von Patienten mit *non-ST-elevation myocardial infarction* (NSTEMI) sechs Stunden nach Beginn der Thoraxschmerzen ebenso deutlich erhöhte Durchschnittswerte von VTN im Vergleich zu einer Kontrollgruppe detektiert. Der durchschnittliche VTN-Wert bei Patienten mit *ST-elevation myocardial infarction* (STEMI) war dabei noch höher als in der NSTEMI-Gruppe ²²¹. In derselben Studie konnten allein anhand der Höhe der VTN-Spiegel wiederholte kardiovaskuläre Ereignisse im Verlauf der ersten sechs Monate nach stattgehabtem Infarkt prognostiziert werden. Die VTN-Werte der NSTEMI-Gruppe korrelierten darüber hinaus mit dem Gensini-Score (Score zur Erfassung des Schweregrades der KHK) ²²¹. In dieser Hinsicht könnte VTN in Zukunft möglicherweise als eine Art Prognosefaktor bei Patienten mit KHK und akutem Koronarsyndrom, wie Myokardinfarkt, herangezogen werden, wobei ein hoher VTN-Spiegel einen ungünstigen kardiovaskulären Verlauf

vermuten lässt ^{221, 222}. In einer weiteren Studie wurde die Auswirkung der sogenannten ischämischen Konditionierung auf die Konzentration verschiedener Plasmaproteine untersucht ²²³. Die ischämische Konditionierung bezeichnet die mehrmalige, einige Minuten andauernde Unterbindung des Blutflusses (z.B. durch eine Blutdruckmanschette) mit anschließender Reperfusion, wodurch das Ausmaß des IRS im Falle eines nachfolgenden tatsächlichen prolongierten Gefäßverschlusses (z.B. akuter Myokardinfarkt) durch Aktivierung körpereigener Schutzmechanismen begrenzt werden kann ²²⁴. An einer Gruppe freiwilliger Personen wurde eine Abnahme der Serumspiegel von VTN und des Komplementproteins C3 nach ischämischer Konditionierung des Oberarms beobachtet ²²³. In diesem Zusammenhang ist es denkbar, dass ein erniedrigter VTN-Wert wesentlich zum protektiven Effekt der ischämischen Konditionierung beiträgt und auf diese Weise den nachfolgenden IRS begrenzt ²²³. Eine andere Studie, die das myokardiale *Remodeling* nach Herzinfarkt in VTN^{-/-}-Mäusen sowie Wildtyp (WT)-Mäusen untersuchte, zeigte 28 Tage nach Induktion eines Myokardinfarktes des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) positive Auswirkungen einer VTN-Defizienz hinsichtlich der sich anschließenden Wundheilung. Dies äußerte sich in einem verminderten kardialen *Remodeling* mit reduzierter Kollagen- bzw. Narbenbildung, einer verbesserten Geweberegeneration sowie einer verbesserten linksventrikulären Pumpfunktion in VTN-defizienten Mäusen ²¹⁷. Die zugrundeliegenden Mechanismen der negativen kardiovaskulären Auswirkung erhöhter VTN-Spiegel bzw. der mögliche protektive Effekt erniedrigter VTN-Spiegel sind bislang nicht erforscht. Ebenfalls ist die Bedeutung von VTN für die Rekrutierung von Leukozyten im Kontext des IRS bislang unzureichend geklärt. In einer neueren Studie wurden erhöhte VTN-Konzentrationen im Gewebe mit einer verstärkten Chemotaxis und Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in Verbindung gebracht ²²⁵. Eine andere Studie berichtet von einer im Vergleich zu VTN-defizienten Mäusen signifikant vermehrten Infiltration von Makrophagen in das ischämisch geschädigte Gewebe von WT-Tieren sieben Tage nach Ligation der Femoralarterie ¹³³. Dieselbe Studie gibt konkrete Hinweise für eine durch VTN induzierte Steigerung der vaskulären Permeabilität unter

ischämischen Bedingungen. *In vitro* konnte der zugrundeliegende Mechanismus auf die durch Bindung von multimerem VTN an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin vermittelte Internalisierung von endotheliale VE-Cadherin zurückgeführt werden. Auf diese Weise werden interendotheliale Zellkontakte geöffnet und somit die Endothelschicht nicht nur für Plasma, sondern vermutlich auch für Immunzellen, durchlässiger gemacht ¹³³. Diese Beobachtung scheint im Widerspruch zu einer anderen Studie zu stehen, die unter physiologischen Bedingungen eine Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion von Venolen durch Interaktion von VTN mit Integrinen nachwies ²²⁶. Ein möglicher Erklärungsansatz für die gegensätzlichen Beobachtungen könnte in der Berücksichtigung des Konformationszustandes bzw. der Multimerisierung von VTN im Rahmen pathologischer Zustände, wie Gewebeschädigungen, liegen ¹³³. In diesem Zusammenhang löste in den genannten *In-vitro*-Untersuchungen nur multimeres, nicht jedoch monomeres VTN eine Redistribution bzw. Internalisierung von VE-Cadherin aus ¹³³. Da es Hinweise gibt, dass die Ischämie selbst eine Multimerisierung von VTN in der betroffenen Muskulatur induziert, könnte damit die VTN-vermittelte Permeabilitätssteigerung nach Ischämie erklärt werden ¹³³. Die vermehrte Expression von VTN im ischämischen Gewebe wird hingegen sowohl auf eine gesteigerte lokale Produktion als auch auf eine verstärkte Extravasation von VTN zurückgeführt ¹³³. Darüber hinaus wird ein Zusammenhang zwischen den VTN-Ablagerungen und der gesteigerten Angiogenese in Folge eines ischämischen Schadens vermutet ¹³³. Ein detaillierteres Verständnis der Bedeutung und Funktion von VTN in Bezug auf die genannten Punkte könnte entscheidend dazu beitragen, gezielte Therapieansätze zur Reduktion der Gewebeschädigung nach I/R zu entwickeln. Insbesondere in Hinblick auf die Schlüsselfunktion der neutrophilen Granulozyten und Monozyten in der Genese des IRS wäre es nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern vor allem von klinischer Bedeutung, sich eine mögliche Einflussnahme von VTN auf die Leukozytenrekrutierung bei I/R therapeutisch zu Nutze machen zu können. Da die Fragestellung nach einer derartigen Einflussnahme in Studien bisher unzulänglich untersucht wurde, haben wir darauf basierend unsere Arbeitshypothese formuliert.

3 Zielsetzung

Folgende Zielsetzung wurde für die vorliegende Dissertationsarbeit definiert:

Untersuchung der Bedeutung des Glykoproteins Vitronektin für die Extravasation von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen/klassischen Monozyten nach Ischämie-Reperfusion und Identifizierung der zugrundeliegenden Mechanismen

4 Material und Methoden

4.1 Utensilien

Versuchstiere:

männliche WT-Mäuse der Linie C57BL/6N	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
männliche heterozygote (VTN ^{+/-}) und homozygote (VTN ^{-/-}) VTN-defiziente Mäuse	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

Geräte:

Operationsmikroskop (5- bis 42-fache Vergrößerung)	Leitz, Wetzlar, Deutschland
AxioTech-Vario 100 Mikroskop mit:	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
- Colibri LED Lichtquelle	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
- Filterblock 62HE, ausgestattet mit dichroitischen Filtern und Emissionsfiltern [TFT 495 + 610 (HE); TBP 527 + LP615 (HE)]	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
- Wasserimmersionsobjektiv (20-fache Vergrößerung; 0,5 NA)	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
- AxioCam Hsm	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Zellzählgerät (Coulter® AC-T-Serie)	Coulter Corporation, Miami, FL, USA
Durchflusszytometer (Gallios)	Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA
Wärmeschrank	WTC Binder, Tuttlingen, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Leica SP5) mit Öl-Immersion-Linse (Leica; 63x; NA 1,4)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Reagenzien und Lösungen:

Isofluran	Forene®; Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Ketamin	Ketavet; Pfizer, Berlin, Deutschland
Xylazin	Rompun 2 %; Bayer, Leverkusen, Deutschland

Antikörper (AK):

AK für durchflusszytometrische Analysen:

monoklonaler anti-CD45 APC-Cy7 AK	Klon 30-F7; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
monoklonaler anti-CD11b FITC AK	Klon M1/70; eBioscience, San Diego, CA, USA
monoklonaler anti-Gr-1 PE AK	Klon RB6-5C8; eBioscience, San Diego, CA, USA
monoklonaler anti-CD115 APC AK	Klon AFS98; eBioscience, San Diego, CA, USA
monoklonaler anti-F4/80 eFluor® 450 AK	Klon BM8; eBioscience, San Diego, CA, USA
monoklonaler anti-CD11a PE-Cy7 AK	Klon M17/4; eBioscience, San Diego, CA, USA
monoklonaler anti-CD49d FITC AK	Klon R1-2; eBioscience, San Diego, CA, USA
monoklonaler anti-IgG Fc PE AK	Maus anti-Mensch; Klon JDC-10; SouthernBiotech, Birmingham, USA
monoklonaler anti-Gr-1 Alexa Fluor® 700 AK	Klon RB6-8C5; eBioscience, San Diego, CA, USA

Fluoreszenzmarkierte AK zur Visualisierung der neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten in der Intravitalmikroskopie:

monoklonaler anti-Ly6G PE AK	Klon 1A8; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
monoklonaler anti-GPIIb DyLight 649 AK	Klon anti-GPIIb derivative; Emfret Analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt, Deutschland

AK zur Immunfärbung:

Primäre AK:

anti-Vitronectin AK	Kaninchen anti-Maus; Klon EP873Y (ab45139); Abcam®, Cambridge, MA, USA oder: Ratte anti-Maus; Klon 347317; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
anti-PAI-1 AK	Kaninchen anti-Maus; PAI-1 (H-135): sc-8979; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
anti-PECAM-1/CD31 Alexa Fluor® 647 AK	Ratte anti-Maus; Klon 390; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA
anti-Ly6G Alexa Fluor® 647 AK	Ratte anti-Maus; Klon RB6-8C5; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA

Sekundäre AK:

anti-IgG Alexa Fluor® 488 AK	Ziege anti-Ratte; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
anti-IgG Alexa Fluor® 555 AK	Esel anti-Kaninchen; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA

anti-IgG Alexa Fluor® 633 AK	Ziege anti-Kaninchen; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Neutral-gepufferte Formaldehydlösung 4 %	Microcos GmbH, Garching, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PermaFluor	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Rekombinantes murines CCL2	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Rekombinantes murines CXCL1	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Vitronektin	Natural Mouse Vitronectin protein (ab92727); Abcam®, Cambridge, MA, USA
RAP	Human RAP Low Endotoxin; Loxo GmbH, Dossenheim, Deutschland
PAI-1	Mouse PAI-1 (wild type active form); Loxo GmbH, Dossenheim, Deutschland
uPA	Active mouse urokinase, HMW; Molecular Innovations, Novi, MI, USA
ICAM-1	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
VCAM-1	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
<u>MAP-Kinase-Inhibitoren:</u>	
SP600125 (JNK-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SB203580 (p38-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FR180204 (ERK1/2-Inhibitor)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
FITC-Dextran (150 kDa)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Heparin	Heparin-Natrium-25000-ratiopharm; Ratiopharm, Ulm, Deutschland
BD FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Apotheke Klinikum der Universität München, München, Deutschland
Kochsalzlösung (NaCl)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Alkoholisches Schnell-Desinfektionsmittel (BacilloI®)	BODE Chemie, Hamburg, Deutschland

Materialien:

Kanüle 30 G	Sterican; B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kanüle 20 G	BD Microlance 3; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
5 ml Spritzen	BD Discardit™ II, Heidelberg, Deutschland
1 ml Spritzen	B.Braun Injekt®-F, Hessen, Deutschland
Falcon-Tube	BD Falcon Tube; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Polypropylenkatheter (Ø 0,28 mm)	Portex, Lythe, Großbritannien
Gefäßklemme	Martin, Tuttlingen, Deutschland
Fluoreszierende Mikrosphären (Ø 0,96 µm)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Deckplättchen (18 mm x 18 mm)	Menzel-Gläser; Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland
Objektträger	SuperFrost® Plus; Menzel Gläser; Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Deutschland

Software:

AxioVision 4.6	Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
MS Excel 2010	Microsoft, Washington, D.C., USA
SigmaPlot 12.0	Systat Software Inc, San Jose, CA, USA
FlowJow V10	Data Analysis Software, Ashland, OR, USA

4.2 Vorbemerkung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von 2013 bis 2015 mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 55.2-1-54-2531.84/09 und 55.2-1-54-2532-115-12) im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der LMU München durchgeführt.

4.3 Versuchstiere

Zur Durchführung der folgenden Versuche wurden Mäuse verschiedener Zuchtlinien verwendet: Männliche WT-Mäuse der Linie C57BL/6N (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) dienten als Versuchstiere für die Analyse der Expression von VTN auf den Endothelzellen von postkapillären Venolen sowie der Expression von VTN und PAI-1 auf neutrophilen Granulozyten. Dieselben Tiere wurden verwendet um das Bindungspotential von leukozytären β 2-Integrinen zu ihrem Liganden ICAM-1 unter dem Einfluss verschiedener Moleküle (VTN, PAI-1, uPA, VTN + PAI-1, VTN + uPA, *receptor-* bzw. *LRP1-associated protein* (RAP, LRPAP1), mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK)-Inhibitoren) zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Bedeutung von VTN für die Leukozytenrekrutierung im Peritonitismodell wurden männliche WT C57BL/6N-Mäuse sowie männliche heterozygote (VTN^{+/-}) und homozygote (VTN^{-/-}) VTN-defiziente Mäuse (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) verwendet. Die Rolle von VTN für die einzelnen Schritte der Leukozytenextravasation nach I/R sowie für die Interaktion zwischen adhärenenten neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten nach I/R wurde anhand von männlichen WT C57BL/6N-Mäusen sowie männlichen VTN^{-/-}-Mäusen analysiert.

Die Bedeutung von CCL2 und MAP-Kinasen für die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs wurde im Peritonitismodell von WT C57BL/6N-Mäusen untersucht. Ebenso dienten diese Tiere der Untersuchung des Einflusses von CCL2 auf die Bindungsaffinität von leukozytären Integrinen zu ihren Liganden ICAM-1 und VCAM-1.

Bei Versuchsdurchführung waren die Tiere acht bis zwölf Wochen alt und 20 bis 30 g schwer. Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin der LMU München in Makrolon-Käfigen zu je drei Tieren gehalten. Neben der Berücksichtigung des Tag-Nacht-Rhythmus wurde den Tieren der freie Zugang zu Wasser und Standardfutter (ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) ermöglicht. Ferner wurde versucht, Stressfaktoren möglichst zu vermeiden.

4.4 Narkose

Im Vorfeld jeglicher Versuchsdurchführungen wurden die Tiere narkotisiert. Zu Beginn wurde eine Kurznarkose mittels eines Gasgemisches aus Distickstoffmonoxid / Lachgas (N_2O) und Isofluran (5,0 Vol.-%; Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 eingeleitet. Im Anschluss daran wurde die Narkose durch intraperitoneale (i.p.) Injektion einer Mischung aus Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht (KG); Ketavet, Pfizer, Berlin, Deutschland), Xylazin (10 mg/kg KG; Rompun 2 %, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Kochsalzlösung im Verhältnis von 2,5 : 0,5 : 7 aufrechterhalten und diese Mischung während der Versuchsdurchführung bei Bedarf wiederholt injiziert. Wärmeplatten und Wärmestrahler dienten der Konstanthaltung der Körpertemperatur des Tieres über die Versuchsdauer.

Für die Experimente im Peritonitismodell wurde allein die Inhalationsnarkose mittels N_2O und Isofluran (siehe oben) in Form einer Kurznarkose angewandt.

4.5 *In-vivo*-Experimente

4.5.1 Peritonitismodell

4.5.1.1 Versuchsdurchführung

Der Einfluss von VTN auf die Extravasation von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen wurde im Peritonitis-Modell untersucht (vgl. **Abb. 5**). Die Versuche wurden in WT-Tieren sowie in heterozygoten und homozygoten VTN-defizienten Mäusen durchgeführt. Dabei wurden die Chemokine *growth related oncogene- α* (CXCL1, GRO α) oder CCL2 als inflammatorischer Stimulus bzw. phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) i.p. appliziert (vgl. Kapitel 4.5.1.3).

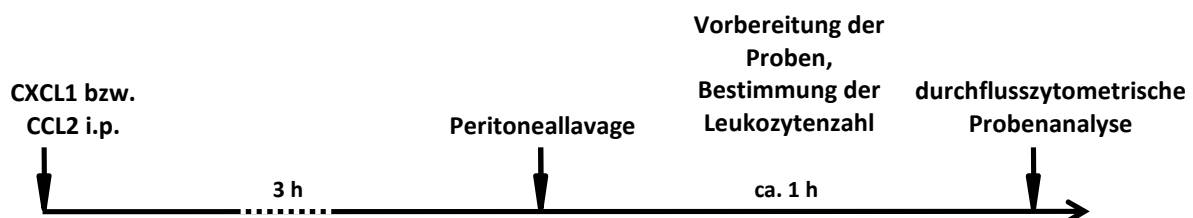


Abb. 5: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Einflusses von VTN auf die Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen im Peritonitismodell.

Das Peritonitismodell wurde ebenso zur Untersuchung des Einflusses von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) auf die CCL2-vermittelte Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs verwendet (vgl. **Abb. 6**). Dabei wurden die MAP-Kinasen p38, c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und *extracellular-signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2) durch intravenöse (i.v.) Applikation der entsprechenden MAP-Kinase-Inhibitoren (SB203580,

SP600125 bzw. FR180204) blockiert bzw. nur das Vehikel in Form eines Gemisches aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und Natriumchlorid (NaCl) i.v. injiziert (vgl. Kapitel 4.5.1.2). 10 Minuten später wurde das Chemokin CCL2 als inflammatorischer Stimulus bzw. NaCl + 0,001 % Albumin i.p. appliziert (vgl. Kapitel 4.5.1.3).

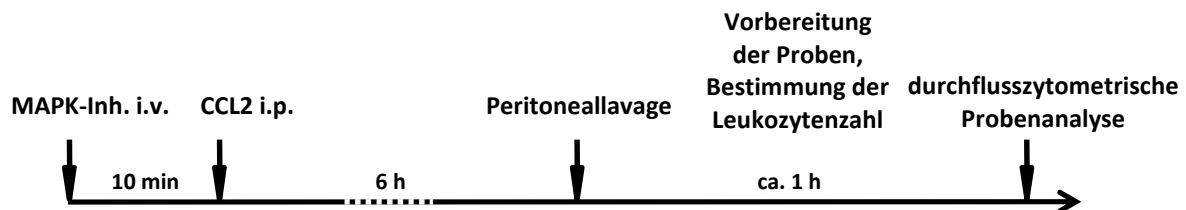


Abb. 6: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Einflusses von MAP-Kinasen auf die Rekrutierung der Leukozytensubpopulationen im Peritonitismodell.

In der Zeit zwischen Applikation des inflammatorischen Stimulus und Durchführung der Peritoneallavage wurden die Versuchstiere jeweils in Einzelkäfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (ssniff Spezialdiäten).

Nach drei bzw. sechs Stunden Stimulationszeit wurde das Versuchstier nach Einleitung einer Kurznarkose (vgl. Kapitel 4.4) durch Genickbruch getötet, auf einer Plattform fixiert und desinfiziert. Zur Durchführung der Peritoneallavage wurden zunächst 10 ml eiskaltes PBS mittels einer dünnen Kanüle (30 G; 100 Sterican; B. Braun, Melsungen, Deutschland) in die Peritonealhöhle injiziert. Die injizierte Flüssigkeit wurde samt den Leukozyten, die in die Peritonealhöhle eingewandert waren, durch eine Butterfly-Kanüle in ein Falcon-Tube (15 ml; BD Falcon Tube; BD Biosciences) geleitet. Sodann wurde 5 ml eiskaltes PBS in die Peritonealhöhle nachgespült und erneut abgelassen. Anschließend wurde die aufgefangene Flüssigkeit (15 ml) bei 25 °C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und der Rückstand mit den Leukozyten auf 500 µl mit PBS aufgefüllt. Durch Bestimmung der Leukozytenzahl in 50 µl dieser Suspension konnte auf die Gesamtzahl sowie die Konzentration der Leukozyten in der Peritoneallavage zurückgerechnet werden (vgl. Kapitel 4.6.1). In weiteren

100 µl der Zellsuspension wurden die Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie (vgl. Kapitel 4.6.2.1) differenziert.

4.5.1.2 Intravenöse Applikation von Reagenzien

Zur Blockade der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2 wurden die entsprechenden MAP-Kinase-Inhibitoren, SB203580 (0,1 mg gelöst in 50 µl DMSO und 150 µl NaCl), SP600125 (0,5 mg gelöst in 50 µl DMSO und 150 µl NaCl), FR180204 (0,5 mg gelöst in 50 µl DMSO und 150 µl NaCl), i.v. in eine Schwanzvene injiziert. Hierfür wurde eine Kurznarkose wie in Kapitel 4.4 beschrieben durchgeführt. Nach Fixierung des Versuchstieres auf einer beheizbaren Metallplatte wurde der Schwanz desinfiziert. Mittels einer 30 G-Nadel (Sterican; B. Braun, Melsungen, Deutschland) und eines Polypropylenkatheters (Innendurchmesser 0,28 mm; Portex, Lythe, Großbritannien) wurde eine Schwanzvene punktiert, die MAP-Kinase-Inhibitoren bzw. nur das Vehikel in Form eines Gemisches aus 50 µl DMSO + 150 µl NaCl darüber injiziert und anschließend der Katheter wieder entfernt.

4.5.1.3 Induktion einer Peritonitis durch intraperitoneale Injektion von Chemokinen

Eine Peritonitis wurde durch i.p.-Applikation der Chemokine CCL2 (0,45 µg gelöst in 600 µl PBS) oder CXCL1 (0,45 µg gelöst in 600 µl PBS) als inflammatorischer Stimulus induziert. Vor Induktion einer Peritonitis wurde eine Kurznarkose nach Kapitel 4.4 eingeleitet und das Tier anschließend auf einer beheizbaren Metallplatte fixiert. Zur Injektion wurde eine dünne

Kanüle (30 G; B. Braun) verwendet. Bis zur Durchführung der Peritoneallavage verweilten die Tiere in Einzelkäfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Standardfutter.

4.5.1.4 Versuchsgruppen

Zur Untersuchung des Einflusses von VTN auf die Leukozytenrekrutierung im Peritonitismodell wurden die Versuchstiere gemäß Zufallsprinzip verschiedenen Gruppen zugeteilt: Es wurden zwei Versuchsreihen gestartet, um die Leukozytenextravasation sowohl unter CXCL1-Stimulation als auch unter CCL2-Stimulation zu untersuchen. Dabei erhielten jeweils WT-Tiere sowie heterozygote und homozygote VTN-defiziente Mäuse eine i.p.-Applikation eines Stimulus (murines rekombinantes CCL2 oder CXCL1) oder eines Kontrollagens (PBS, unstimuliert) (jeweils n=4).

Zur Untersuchung des Einflusses von MAP-Kinasen auf die CCL2-vermittelte Rekrutierung von unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen wurden die Tiere ebenfalls gemäß Zufallsprinzip verschiedenen Gruppen zugeteilt: WT-Tiere erhielten eine i.v.-Injektion einer der MAP-Kinase-Inhibitoren (p38-, JNK-, ERK1/2-Inhibitor) oder des Vehikels (DMSO + NaCl) und zusätzlich eine i.p.-Stimulation mit dem murinen rekombinanten Chemokin CCL2. In einer Kontrollgruppe wurde WT-Tieren ein Gemisch aus NaCl + 0,001 % Albumin i.p. verabreicht (jeweils n=5 - 6).

4.5.2 Kremastermodell

4.5.2.1 Präparation des Kremastermuskels und Katheterisierung der Femoralarterie

Die Bedeutung von VTN für Interaktionen zwischen Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten nach I/R wurde im Kremastermuskel von WT-Tieren und VTN^{-/-}-Mäusen untersucht. Nach Einleitung der Narkose (vgl. Kapitel 4.4) wurde das Versuchstier auf einer beheizbaren Metallplatte fixiert.

Zunächst wurde die Femoralarterie kanüliert. Hierzu wurde die Haut über der linken Leistenregion des Versuchstiers inzidiert und das darunterliegende Gewebe samt der Gefäß-Nerven-Scheide des linken Beines freigelegt. Nach Präparation der Femoralarterie wurde diese mithilfe einer dünnen Kanüle (30 G; 100 Sterican; B. Braun, Melsungen, Deutschland) punktiert und ein Polypropylenkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Portex, Lythe, Großbritannien) retrograd in die Arterie vorgeschoben. Mithilfe von Ligaturen wurde ein Verrutschen des Katheters verhindert und die darüberliegende Haut wieder vernäht.

Im Anschluss daran wurde mit der chirurgischen Präparation des Kremastermuskels begonnen. Diese wurde unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland; 5- bis 42-fache Vergrößerung) nach der Methode der Erstbeschreibung von Baez²²⁷ mit geringeren Modifikationen durchgeführt. Dazu wurde die Haut über dem Hoden ventral inzidiert und der rechte Kremastermuskel durch Entfernung des umgebenden Bindegewebes freigelegt. Bevor der Kremastermuskel längs ventral eröffnet wurde, wurden die Gefäße an der Einschnittsstelle mittels einer bipolaren Pinzette elektrokoaguliert um stärkere Blutungen zu verhindern. Der Kremastermuskel wurde auf einem kleinen Podest über eine spezialangefertigte Bühne aufgespannt. Während der beschriebenen chirurgischen Präparation sowie

während des gesamten Versuchsablaufs wurde der Kremastermuskel mit körpertemperierter gepufferter physiologischer Kochsalzlösung superfundiert.

4.5.2.2 Intraarterielle Applikation von monoklonalen Antikörpern und anderen Reagenzien

Über intraarterielle (i.a.) Injektion von fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern via zuvor gelegtem Femoraliskatheter (vgl. Kapitel 4.5.2.1) konnten verschiedene Blutzellen wie Thrombozyten (anti-GPIIb/IIIa Antikörper; 5 μ l) und neutrophile Granulozyten (anti-Ly6G Antikörper; 5 μ l) visualisiert werden. Die i.a.-Injektion von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Dextran (150 kDa) erlaubte die Sichtbarmachung des Blutgefäßes. Durch Injektion von Mikropartikeln (\varnothing 0,96 μ m; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) konnte die Blutfließgeschwindigkeit in den untersuchten Gefäßsegmenten ermittelt werden.

4.5.2.3 Reversible, globale Ischämie und Reperfusion des Kremastermuskels

Eine reversible, globale Ischämie des rechten Kremastermuskels wurde durch Abklemmen aller zu- und abführenden Gefäße an der Basis des Muskels mittels einer Gefäßklemme (Martin, Tuttlingen, Deutschland) ausgelöst. Intravitalmikroskopisch konnte das Sistieren des Blutflusses überprüft werden. Nach einer Ischämiezeit von 30 Minuten wurde die Gefäßklemme wieder entfernt und somit der Kremastermuskel reperfundiert. Nach einer Reperfusionzeit von 120 Minuten wurden die intravitalmikroskopischen Aufnahmen zur Untersuchung der einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung durchgeführt (vgl. Kapitel 4.5.2.5).

4.5.2.4 Blutentnahme über die *Vena cava inferior*

Eine Blutentnahme über die *Vena cava inferior* (*V. cava inf.*) wurde nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Aufnahmen zur Durchführung verschiedener Messungen wie die Bestimmung der systemischen Leukozytenzahl (vgl. Kapitel 4.6.1) und anderer Blutzellparameter angewandt. Ebenso zur Gewinnung von Blut für *In-vitro*-Versuche, wie der Expressionsanalyse von leukozytären Integrinen (vgl. Kapitel 4.6.2.2) und den *Binding-Assays* (vgl. Kapitel 4.6.2.3), diente die *V. cava inf.* als gut zugänglicher Punktionsort. Zur Durchführung der Blutentnahme wurde das Tier in tiefe Narkose versetzt (vgl. Kapitel 4.4). Daraufhin wurde die Bauchhöhle unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Leitz) eröffnet. Nach Freipräparation der *V. cava inf.* wurde diese mithilfe einer mit Heparin (10 µl; Heparin-Natrium-25000-ratiopharm; Ratiopharm, Ulm, Deutschland) befüllten Spritze und einer Kanüle (20 G; BD Microlance 3; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) punktiert.

4.5.2.5 Intravitalmikroskopie

Mithilfe der Intravitalmikroskopie (IVM) konnten die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung visualisiert werden. Unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten, gegen Ly6G gerichteten, monoklonalen Antikörpers wurden neutrophile Granulozyten markiert (vgl. Kapitel 4.5.2.2). Die Kombination von Transilluminations- und Fluoreszenz-Intravitalmikroskopie machte es möglich, neben den Gefäßen auch verschiedene Leukozytensubpopulationen voneinander zu unterscheiden.

In weiteren Versuchen wurde durch zusätzlichen Einsatz eines fluoreszenzmarkierten, gegen GPIIb/IIIa gerichteten, monoklonalen Antikörpers neben den neutrophilen Granulozyten auch die Thrombozyten sichtbar gemacht (vgl. Kapitel 4.5.2.2). Auf diese Weise konnte der Ein-

fluss von VTN auf Interaktionen zwischen Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten nach I/R analysiert werden. Zur Darstellung der Blutgefäße in der Fluoreszenzmikroskopie wurde der Gefäßmarker FITC-Dextran i.a. appliziert (vgl. Kapitel 4.5.2.2).

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden mithilfe eines AxioTech-Vario 100 Mikroskops (Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Neben der *reflected light oblique transillumination* (RLOT)-Mikroskopie²²⁸ ist die Fluoreszenz-Epiilluminationsmikroskopie mithilfe einer Colibri LED Lichtquelle (Zeiss MicroImaging GmbH) möglich. Das Licht wurde über den Filterblock 62HE (Zeiss MicroImaging GmbH) mit dichroitischen- und Emissionsfiltern [TFT 495 + 610 (HE); TBP 527 + LP615 (HE)] auf den Kremastermuskel gelenkt. Für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Wasse-rimmersionsobjektiv mit 20-facher Vergrößerung (0,5 NA; Zeiss MicroImaging GmbH) verwendet. Die Vorgänge im mikrovaskulären Stromgebiet konnten mit der digitalen Kamera AxioCam Hsm (Zeiss MicroImaging GmbH) als Videoclip aufgenommen werden und mit der Software Axio Vision 4.6 (Zeiss MicroImaging GmbH) auf dem Monitor dargestellt und bearbeitet werden.

4.5.2.6 Leukozytenkinetik und mikrohämodynamische Parameter

Zur Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Kapitel 4.5.2.5) wurde die Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) benutzt.

Als wichtige Parameter der Leukozytenrekrutierung wurden die Anzahl der rollenden Leukozyten, die Rollgeschwindigkeit, die Anzahl der kurz sowie der fest adhärennten Leukozyten, die Adhärenzzeit und die Anzahl der transmigrierten Leukozyten nach I/R (vgl. Kapitel 4.5.2.3) in den verschiedenen Versuchsgruppen (vgl. Kapitel 4.5.2.8) analysiert. Die genannten Parameter wurden im Kremastermuskel in unverzweigten, longitudinal ausgerichteten,

etwa 25 μm durchmessenden postkapillären Venolen von 100 μm Länge bestimmt. Rollende Leukozyten kennzeichneten sich dadurch, dass sie sich aufgrund von Endothelzellkontakten langsamer bewegten als der Blutfluss. Die rollenden Leukozyten wurden über ein Zeitintervall von 30 Sekunden ausgezählt. Als adhärent wurden Leukozyten definiert, die am Gefäßendothel hafteten und sich nicht mehr als um den eigenen Durchmesser bewegten. Die Adhärenz der Leukozyten wurde je nach Dauer als kurze oder feste Adhärenz bezeichnet: Kurz adhärente Leukozyten wurden als jene Leukozyten definiert, die kürzer als 30 Sekunden am Endothel hafteten und fest adhärente Leukozyten als jene mit einer Adhärenzzeit von über 30 Sekunden. Ebenso wurde die Adhärenzzeit der einzelnen Leukozyten quantifiziert. Zur Untersuchung der Transmigration wurden zu beiden Seiten eines Gefäßes die ausgewanderten Leukozyten in einer Fläche von jeweils 100 μm Länge und 75 μm Breite ausgezählt. Alle Parameter wurden in 3 postkapillären Venolen pro Versuchstier ausgewertet. Daraus wurden die jeweiligen Mittelwerte bestimmt.

Der Anteil der rekrutierten neutrophilen Granulozyten an der Gesamtzahl rekrutierter Leukozyten konnte durch die zuvor durchgeführte i.a.-Injektion von fluoreszierenden monoklonalen anti-Ly6G Antikörpern (vgl. Kapitel 4.5.2.2) ermittelt werden.

Zur Ermittlung der zentralen Blutfließgeschwindigkeit wurden grün fluoreszierende Mikrosphären (\varnothing 0,96 μm ; Molecular Probes, Leiden, Niederlande) i.a. injiziert. Durch Kenntnis der zurückgelegten Strecke der Mikrosphären in zwei aufeinander folgenden Bildern und dem Zeitintervall zwischen diesen Bildern konnte die Blutfließgeschwindigkeit ermittelt werden. Pro Gefäß wurde ein Mittelwert aus drei Messungen berechnet.

Ferner wurde die Wandscherrate aus den ermittelten Gefäßdurchmessern und der zentralen Blutfließgeschwindigkeit berechnet. Dabei wurde eine parabolische Flussgeschwindigkeitskurve über den Gefäßquerschnitt angenommen.

4.5.2.7 Thrombozytenadhärenz sowie Interaktion/Kolokalisation adhärenter neutrophiler Granulozyten mit adhärenenten Thrombozyten

Zur Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Kapitel 4.5.2.5) wurde die Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) benutzt.

Als Parameter wurden die Anzahl der fest adhärenenten neutrophilen Granulozyten sowie die Anzahl der fest adhärenenten Thrombozyten bestimmt. Darüber hinaus wurde die Kolokalisation dieser Blutzellen analysiert. Die genannten Parameter wurden im Kremastermuskel in unverzweigten, longitudinal ausgerichteten, etwa 25 µm durchmessenden postkapillären Venolen von 100 µm Länge bestimmt. Neutrophile Granulozyten und Thrombozyten wurden im Vorfeld durch entsprechende fluoreszierende Antikörper visualisiert (vgl. Kapitel 4.5.2.2). Fest adhärenente Leukozyten wurden wie in Kapitel 4.5.2.6 beschrieben definiert. Entsprechend wurden Thrombozyten, die länger als 30 Sekunden fest an der Gefäßwand hafteten, als fest adhärenente Thrombozyten charakterisiert. Das Interaktionsverhalten zwischen den genannten Blutzellen wurde untersucht, indem der Anteil von adhärenenten neutrophilen Granulozyten ermittelt wurde, der mit adhärenenten Thrombozyten am Gefäßendothel kolokalisierte. Die beschriebenen Größen wurden in drei postkapillären Venolen pro Versuchstier ausgewertet. Daraus wurden die jeweiligen Mittelwerte gebildet.

4.5.2.8 Versuchsgruppen

Zur Untersuchung der Bedeutung von VTN für die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung nach I/R wurden die einzelnen Parameter (vgl. Kapitel 4.5.2.6) in einer Gruppe von WT-Tieren und einer Gruppe von VTN^{-/-}-Mäusen bestimmt (jeweils n=4 mit Bestimmung der Parameter in drei postkapillären Venolen pro Versuchstier).

Ebenso wurden zur Untersuchung der Bedeutung von VTN für die feste Adhärenz von Thrombozyten sowie für die Interaktion/Kolokalisation zwischen neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten nach I/R die Parameter (vgl. Kapitel 4.5.2.7) in einer Gruppe von WT-Tieren und einer Gruppe von VTN^{-/-}-Mäusen bestimmt (jeweils n=4 mit Bestimmung der Parameter in drei postkapillären Venolen pro Versuchstier).

4.5.2.9 Versuchsaufbau

Zur Untersuchung der Bedeutung von VTN für das Rollen, die Adhärenz sowie die Transmigration von rekrutierten Leukozyten myeloiden Ursprungs nach I/R des Kremastermuskels diente folgender Versuchsaufbau (vgl. **Abb. 7**): Nach Kremasterpräparation des narkotisierten Versuchstiers (vgl. Kapitel 4.4 und 4.5.2.1) wurde zur Unterscheidung der verschiedenen Leukozytensubpopulationen bzw. zur Visualisierung von neutrophilen Granulozyten ein fluoreszenzmarkierter, gegen Ly6G gerichteter, monoklonaler Antikörper i.a. appliziert (vgl. Kapitel 4.5.2.2). Der aufgespannte Kremastermuskel wurde mithilfe einer Gefäßklemme abgeklemmt und somit eine globale Ischämie des Muskels induziert. Nach einer Ischämiedauer von 30 Minuten wurde die Gefäßklemme wieder entfernt und die Reperfusion des Kremastermuskels eingeleitet (vgl. Kapitel 4.5.2.3). Nach Ablauf der 120-minütigen Reperfusionszeit wurden die Effekte von I/R auf die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung (vgl. Kapitel 4.5.2.6) in WT-Tieren und homozygoten VTN-defizienten Mäusen (vgl. Kapitel 4.5.2.8) intravitalmikroskopisch untersucht (vgl. Kapitel 4.5.2.5). Dabei wurden die einzelnen Parameter (vgl. Kapitel 4.5.2.6) in drei postkapillären Venolen pro Versuchstier analysiert. Die zentrale Blutfließgeschwindigkeit wurde mithilfe von grün fluoreszierenden Mikrosphären berechnet (vgl. Kapitel 4.5.2.6). Am Ende der Versuchsdurchführung erfolgten das Entbluten des Versuchstieres über die untere Hohlvene (vgl. Kapitel 4.5.2.4) und der Genickbruch. Die systemische Leukozytenzahl wurde im Vollblut bestimmt (vgl. Kapitel 4.6.1).

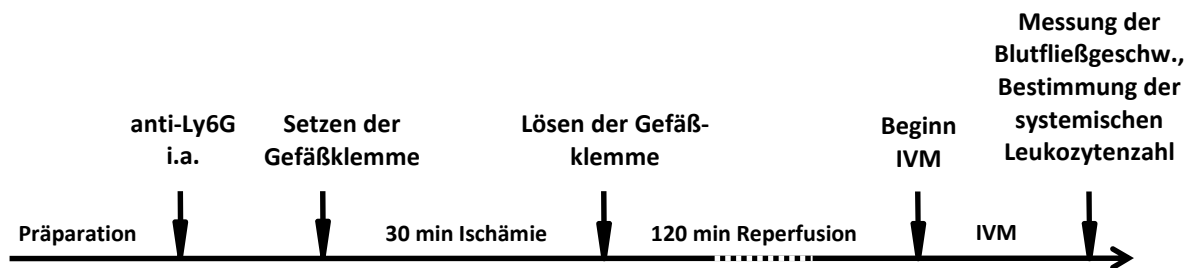


Abb. 7: Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Bedeutung von VTN für die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung nach I/R.

Der Versuchsablauf zur Untersuchung der Bedeutung von VTN für die Thrombozytenadhärenz sowie für die Interaktion und Kolokalisation von adhärenenten neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten im Ischämie-Reperusionsmodell (vgl. **Abb. 8**) entspricht weitgehend dem zur Untersuchung der einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung wie oben beschrieben. Neben dem gegen Ly6G gerichteten Antikörper zur Visualisierung der neutrophilen Granulozyten wurden die Thrombozyten mithilfe des fluoreszenzmarkierten, gegen GPIIb/IIIa gerichteten, monoklonalen Antikörpers sichtbar gemacht. Auf diese Weise konnte die feste Adhärenz von Thrombozyten sowie die Interaktion von adhärenenten neutrophilen Granulozyten mit adhärenenten Thrombozyten analysiert werden (vgl. Kapitel 4.5.2.5 und 4.5.2.7).

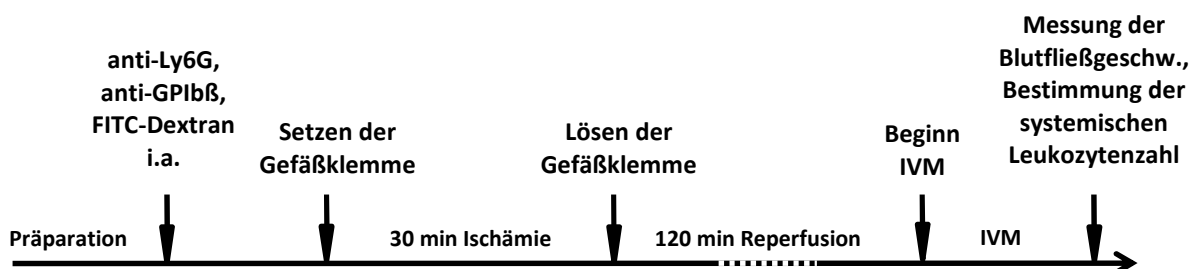


Abb. 8: Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Bedeutung von VTN für die feste Adhärenz von Thrombozyten sowie für die Interaktion/Kolokalisation von adhärenenten neutrophilen Granulozyten mit adhärenenten Thrombozyten nach I/R.

4.6 Ex-vivo-Experimente

4.6.1 Bestimmung der Leukozytenzahl

Mithilfe eines Zellzählgerätes (Coulter® AC-T-Serie; Coulter Corporation) konnte im Peritonitismodell die Gesamtzahl an Leukozyten in der Peritoneallavage sowie im Kremastermodell die systemische Leukozytenzahl aus dem Vollblut der *V. cava* bestimmt werden. Die Leukozytenzahl wurde jeweils in der Einheit [$n \times 10^3$ pro μl] angegeben.

4.6.2 Durchflusszytometrie

4.6.2.1 Analyse der Peritoneallavage mittels Durchflusszytometrie

Zur Untersuchung der Rekrutierung einzelner Leukozytensubpopulationen im Peritonitismodell (vgl. Kapitel 4.5.1.1) wurde die Durchflusszytometrie angewandt. Hiermit konnten die aus der Peritonealhöhle der Versuchstiere gespülten Leukozytenpopulationen differenziert werden. 100 μl der auf 500 μl mit PBS aufgefüllten Zellsuspension (vgl. Kapitel 4.5.1.1) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Folgende fluoreszenzmarkierte Antikörper wurden hierfür verwendet: monoklonaler anti-CD45 APC-Cy7 Antikörper (Klon 30-F7; BD Biosciences), monoklonaler anti-F4/80 eFluor® 450 Antikörper (Klon BM8; eBioscience, San Diego, CA, USA), monoklonaler anti-CD11b FITC Antikörper (Klon M1/70; eBioscience, San Diego, CA, USA), monoklonaler anti-CD115 APC Antikörper (Klon AFS98; eBioscience), monoklonaler anti-Gr-1 PE Antikörper (Klon RB6-5C8;

eBioscience). Mithilfe eines Lyse-Puffers (1:10; 2 ml; 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT); BD FACS Lysing Solution; BD Biosciences) wurden die Erythrozyten entfernt. Durch zweimaliges Waschen mit PBS und erneuter Zugabe von 250 µl PBS wurden die Proben für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet.

Die Analyse am Durchflusszytometer (Gallios; Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA) erfolgte folgendermaßen: Über den Panleukozytenmarker CD45 wurden vorerst die Leukozyten identifiziert. In einem weiteren Schritt konnten mithilfe des anti-F4/80 Antikörpers die Makrophagen (F4/80⁺⁺) von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Anhand der Expression von CD11b konnten die Leukozyten myeloiden Ursprungs aus dem verbleibenden Zellpool erfasst werden. Die Leukozyten myeloiden Ursprungs (CD45⁺ CD11b⁺ Zellen) wurden weiter untergliedert in neutrophile Granulozyten (hohe Expression von Gr-1 und niedrige Expression von CD115), inflammatorische/klassische Monozyten (hohe Expression von Gr-1 und CD115) sowie nicht-klassische Monozyten (niedrige Expression von Gr-1 und hohe Expression von CD115).

4.6.2.2 Analyse der Integrinexpression mittels Durchflusszytometrie

Die Analyse der Integrinexpression erfolgte jeweils in heparinisiertem Vollblut von WT-Tieren (vgl. Kapitel 4.5.2.4).

1. Zur Analyse des Einflusses von VTN, PAI-1, uPA, VTN-PAI-1-Komplex oder VTN-uPA-Komplex auf die Expression der β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten diente folgender Versuchsansatz: Jeweils 100 µl des Blutes wurden mit VTN (100 ng), PAI-1 (100 ng), uPA (100 ng), VTN (100 ng) + PAI-1 (100 ng), VTN (100 ng) + uPA (100 ng) oder PBS versetzt. Nach einer Stimulationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurden zur Quantifizierung der

Expression von β 2-Integrinen folgende primäre monoklonale Antikörper den Proben hinzugefügt: anti-CD11a PE-Cy7 Antikörper (Klon M17/4; eBioscience) und anti-CD11b FITC Antikörper (Klon M1/70; eBioscience). Das weitere Vorgehen ist unter Punkt 4 beschrieben.

2. Ebenso wurde die durch den VTN-PAI-1-Komplex induzierte Expression von β 2-Integrinen nach Inkubation mit RAP oder jeweils einem der MAP-Kinase-Inhibitoren untersucht. Hierfür diente ein ähnlicher Versuchsansatz wie in Punkt 1: Jeweils 100 μ l des Blutes wurden mit VTN (100 ng) + PAI-1 (100 ng) sowie entweder RAP (100 μ M), SP600125 (JNK-Inhibitor; 5 μ M), SB203580 (p38-Inhibitor; 25 μ M), FR180204 (ERK1/2-Inhibitor; 15 μ M) oder dem Vehikel (PBS) versetzt. Nach einer Stimulationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurden zur Quantifizierung der Expression von β 2-Integrinen folgende primäre monoklonale Antikörper den Proben hinzugefügt: anti-CD11a PE-Cy7 Antikörper (Klon M17/4; eBioscience) und anti-CD11b FITC Antikörper (Klon M1/70; eBioscience). Das weitere Vorgehen ist unter Punkt 4 beschrieben.
3. Zur Untersuchung des Einflusses des Chemokins CCL2 auf die Expression von β 2-Integrinen und des β 1-Integrins VLA-4 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten bzw. inflammatorischen/klassischen oder nicht-klassischen Monozyten diente folgender Versuchsansatz: Jeweils 100 μ l des Blutes wurden mit CCL2 (100 ng/ml), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; 50 ng/ml; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) oder PBS versetzt. Nach einer Stimulationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurden zur Quantifizierung der Expression von β 1- und β 2-Integrinen folgende primäre monoklonale Antikörper den Proben hinzugefügt: anti-CD11a PE-Cy7 Antikörper (Klon M17/4; eBioscience) und anti-CD11b FITC Antikörper (Klon M1/70; eBioscience), oder anti-CD49d FITC Antikörper (Klon R1-2; eBioscience). Das weitere Vorgehen ist unter Punkt 4 beschrieben.

4. Zusätzlich zu den unter Punkt 1, 2 und 3 genannten Antikörpern wurden die Proben zur Differenzierung der myeloiden Leukozytenpopulationen jeweils mit folgenden primären monoklonalen Antikörpern versetzt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert: anti-CD45 APC-Cy7 Antikörper (Klon 30-F7; BD Biosciences), anti-Gr-1 PE Antikörper (Klon RB6-5C8; eBioscience), anti-F4/80 eFluor® 450 Antikörper (Klon BM8; eBioscience) und anti-CD115 APC Antikörper (Klon AFS98; eBioscience). Als nächstes wurden die Erythrozyten durch Zugabe eines Lyse-Puffers (1:10; 2 ml; 10 Minuten bei RT; BD FACS Lysing Solution; BD Biosciences) lysiert und durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Mithilfe des Durchflusszytometers (Gallios; Beckman Coulter Inc.) wurde die Fluoreszenzintensität der einzelnen Integrine auf den „gefärbten“ Leukozyten analysiert. Dabei wurden etwa 20.000 Ereignisse je Probe gemessen. Die Werte für die Fluoreszenzintensitäten der mit Isotyp-Antikörpern gefärbten Proben wurden von allen Messergebnissen abgezogen.

4.6.2.3 Binding-Assays

Die Bindung von leukozytären Integrinen an ihre Liganden, den Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie, wurde jeweils in heparinisiertem Vollblut von WT-Tieren untersucht (vgl. Kapitel 4.5.2.4).

1. Zur Analyse des Einflusses von VTN, PAI-1, uPA, VTN-PAI-1-Komplex oder VTN-uPA-Komplex auf die Affinität der neutrophilen $\beta 2$ -Integrine LFA-1 und Mac-1 zu ihrem Liganden ICAM-1 diente folgender Versuchsansatz: Jeweils 50 μ l Blut wurden mit 50 μ l Hank's balanced salt solution (HBSS; 1 mM CaCl_2 und MgCl_2) versetzt und zusätzlich mit einer der folgenden Substanzen bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert: VTN (100 ng), PAI-1 (100 ng), uPA (100 ng), VTN (100 ng) + PAI-1 (100 ng), VTN

(100 ng) + uPA (100 ng) oder PBS. Anschließend wurde durch Zugabe von ICAM-1 (10 µg/ml) die affinitätsabhängige Bindung der Integrine an ihre Liganden induziert. Nach gleichzeitiger Zugabe des PE-markierten Antikörpers anti-IgG Fc (100 ng) wurden die Proben für weitere 5 Minuten bei 37 °C im Trockenschrank gelagert. Das weitere Vorgehen ist unter Punkt 4 beschrieben.

2. Die zugrundeliegenden Mechanismen der durch den VTN-PAI-1-Komplex induzierten Bindung von ICAM-1 durch neutrophile Granulozyten (vgl. Kapitel 5.1.5) wurden detaillierter aufgeschlüsselt. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss des *low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein-1* (LRP1) und der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK1/2 auf die durch den VTN-PAI-1-Komplex induzierte Affinitätssteigerung von β 2-Integrinen auf neutrophilen Granulozyten untersucht. Neben dem VTN-PAI-1-Komplex (siehe Punkt 1) wurden die HBSS-verdünnten Blutproben zusätzlich mit RAP (100 µM) oder mit einem der MAPK-Inhibitoren – SP600125 (JNK-Inhibitor; 5 µM), SB203580 (p38-Inhibitor; 25 µM), FR180204 (ERK1/2-Inhibitor; 15 µM) – versetzt. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wurde durch Zugabe von ICAM-1 (10 µg/ml) die affinitätsabhängige Bindung der Integrine an ihre Liganden induziert. Nach gleichzeitiger Zugabe des PE-markierten Antikörpers anti-IgG Fc (100 ng) wurden die Proben für weitere 5 Minuten bei 37 °C im Trockenschrank gelagert. Das weitere Vorgehen ist unter Punkt 4 beschrieben.
3. Zur Untersuchung des Einflusses des Chemokins CCL2 auf die Affinität von leukozytären β 1-Integrinen zu ihren Liganden VCAM-1 sowie auf die Affinität der β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 zu ihrem Liganden ICAM-1 diente folgender Versuchsansatz: Jeweils 50 µl Blut wurden mit 50 µl HBSS versetzt und zusätzlich mit einem der folgenden Stimuli bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert: Rekombinantes murines CCL2 (100 ng/ml), PMA (50 ng/ml) oder PBS. Anschließend wurde durch Zugabe von ICAM-1 (10 µg/ml) bzw. VCAM-1 (10 µg/ml) die affinitätsabhängige Bindung der

Integrine an ihre Liganden induziert. Nach gleichzeitiger Zugabe des PE-markierten Antikörpers anti-IgG Fc (100 ng) wurden die Proben für weitere 5 Minuten bei 37 °C im Trockenschrank gelagert. Das weitere Vorgehen ist unter Punkt 4 beschrieben.

4. Ein Waschvorgang mit PBS entfernte die nicht gebundenen anti-IgG Fc Antikörper in den in Punkt 1, 2 und 3 vorbereiteten Proben. Anschließend wurden sie zur Differenzierung der myeloiden Leukozytensubpopulationen mit folgenden primären monoklonalen Antikörpern für 30 Minuten auf Eis inkubiert: anti-CD45 APC-Cy7 Antikörper (Klon 30-F7; BD Biosciences), anti-CD11b FITC Antikörper (Klon M1/70; eBioscience), anti-F4/80 eFluor® 450 Antikörper (Klon BM8; eBioscience), anti-Gr-1 Alexa Fluor® 700 Antikörper (Klon RB6-8C5; eBioscience) und anti-CD115 APC Antikörper (Klon AFS98; eBioscience). Nach Lysierung der Erythrozyten und mehrmaligem Waschen mit PBS wurde die Affinität der Integrine zu Ihrem Liganden ICAM-1 (bzw. VCAM-1) mithilfe des Durchflusszytometers (Gallios; Beckman Coulter Inc.) quantifiziert. Dabei wurden etwa 20.000 Ereignisse je Probe gemessen. Von den ermittelten Werten für die Fluoreszenzintensität der gebundenen PE-markierten Antikörper wurden diejenigen der mit Isotyp-Antikörpern gefärbten Proben abgezogen. Das Verhältnis der dadurch erzielten Werte zur Integrinexpression (vgl. Kapitel 4.6.2.2) gab Rückschlüsse auf die durchschnittliche Affinität der β 2- bzw. β 1-Integrine zu ihren Liganden ICAM-1 bzw. VCAM-1.

4.6.3 Konfokalmikroskopie

Die Deposition von VTN auf den Endothelzellen postkapillärer Venolen des Kremastermuskels von WT-Tieren wurde im unstimulierten Zustand sowie nach I/R mithilfe der Konfokalmikroskopie untersucht. Um die Lokalisation der VTN-Expression in Relation zu den En-

endothelzellverbindungen zu charakterisieren wurden Letztere durch immunhistochemische Färbungen des Adhäsionsmoleküls PECAM-1 visualisiert. Der Kremastermuskel wurde zunächst wie in Kapitel 4.5.2.1 beschrieben präpariert. Auf die Katheterisierung der Femoralarterie wurde in diesem Fall verzichtet. Je nach Versuchsgruppe wurde der Kremastermuskel nach einer 30-minütigen Ischämiezeit und anschließenden 120-minütigen Reperfusionphase bzw. nach einer entsprechenden Scheinoperation durch Elektrokauterisierung vom Versuchstier abgelöst (jeweils n=4). Anschließend wurde der isolierte Kremastermuskel für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Applikation einer Lösung aus 10 % Ziegsenserum (Sigma-Aldrich), 0,5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) und PBS für eine Stunde diente dem Blockieren unspezifischer Bindungen und der Permeabilisierung des Gewebes. Sodann wurde der Kremastermuskel für 12 Stunden bei 4 °C mit dem primären Antikörper gegen VTN (Kaninchen anti-Maus; Abcam®) und dem Alexa Fluor® 647-konjugierten anti-PECAM-1/CD31 Antikörper (Ratte anti-Maus; Invitrogen, Molecular Probes) inkubiert. Im Anschluss wurde der sekundäre Alexa Fluor® 555-konjugierte anti-IgG Antikörper der Spezies Esel anti-Kaninchen (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) für 3 Stunden bei Raumtemperatur appliziert. Der gefärbte Kremastermuskel wurde auf einen mit PermaFluor betupften Objektträger übertragen. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen von postkapillären Venolen erfolgten am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica SP5; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mit einer Öl-Immersions-Linse (Leica; 63x; NA 1,4). Mithilfe des Auswerteprogramms ImageJ wurde die Fluoreszenzintensität von VTN auf dem Endothel gemessen.

In weiteren Versuchen wurde die Expression und Lokalisation von VTN und PAI-1 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten in den postkapillären Venolen des Kremastermuskels konfokalmikroskopisch untersucht. Der Versuchsablauf erfolgte entsprechend des oben beschriebenen Procederes, wobei sich die primären und sekundären Antikörper unterschieden: Der Kremastermuskel wurde mit dem primären Alexa Fluor® 647-konjugierten

anti-Ly6G Antikörper (Ratte anti-Maus; Invitrogen, Molecular Probes) zur Visualisierung der neutrophilen Granulozyten sowie mit den primären Antikörpern gegen VTN (Ratte anti-Maus; R&D Systems) und PAI-1 (Kaninchen anti-Maus; Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe nacheinander mit dem sekundären Alexa Fluor® 488-konjugierten anti-IgG Antikörper der Spezies Ziege anti-Ratte und dem sekundären Alexa Fluor® 633-konjugierten anti-IgG Antikörper der Spezies Ziege anti-Kaninchen gegengefärbt.

4.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mithilfe der Software SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA). Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei 2 Versuchsgruppen im t-Test bzw. Rank-Sum-Test, bei mehr als 2 Versuchsgruppen im One Way-ANOVA-Test bzw. ANOVA-on-Ranks-Test gefolgt vom Dunnett-Test ermittelt. Als signifikant betrachtet wurden Unterschiede mit $p < 0,05$. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) bestimmt.

5 Ergebnisse

5.1 Bedeutung von VTN für die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs¹

5.1.1 Analyse der Deposition von VTN auf der Oberfläche von Endothelzellen der Mikrovaskulatur

Zu Beginn unserer Versuchsreihen untersuchten wir den Einfluss von I/R auf die endotheliale Deposition von VTN in postkapillären Venolen, dem Ort der Leukozytenextravasation, im Kremastermuskel. Die VTN-Deposition wurde mithilfe der Konfokalmikroskopie sowohl qualitativ als auch quantitativ im unstimulierten Zustand sowie nach I/R analysiert (**vgl. Abb. 9 A, B**). Durch gleichzeitiges immunhistochemisches „Anfärben“ des endothelialen Adhäsionsmoleküls PECAM-1 konnte die Lokalisation von VTN in Relation zu den Endothelzellverbindungen analysiert werden. Im unstimulierten Zustand war VTN nur in geringem Maße auf dem Endothel der Mikrogefäße des Kremastermuskels nachzuweisen. Nach I/R hingegen stieg das Fluoreszenzsignal für VTN deutlich an. Das Expressionsmuster veränderte sich hingegen nicht: Sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand (nach I/R) war die Deposition von VTN diffus auf dem Endothel verteilt und kolokalisierte nur wenig mit den Endothelzellverbindungen (**vgl. Abb. 9 A**).

¹ Die Daten aus dem Kapitel 5.1 wurden in Versuchen von Frau Dr. rer. nat. Gabriele Zuchtriegel und mir erhoben. Daher möchte ich mich an dieser Stelle für ihre Unterstützung und die Bereitstellung von Daten herzlich bedanken.

Die signifikante Zunahme der endothelialen VTN-Deposition nach I/R konnte durch Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) anhand der konfokalmikroskopischen Aufnahmen verifiziert werden (vgl. Abb. 9 B).

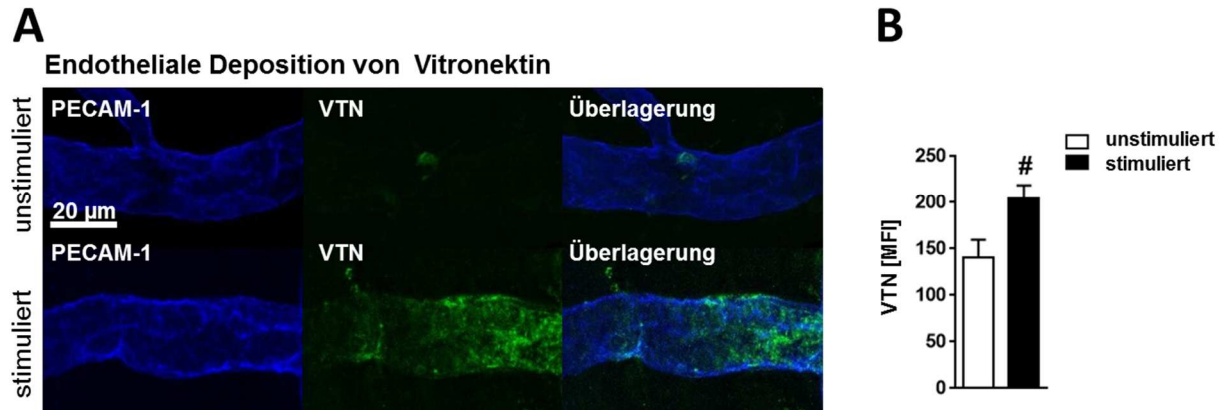


Abb. 9: Konfokalmikroskopische Darstellung der Deposition von VTN und Expression von PECAM-1 in Mikrogefäßen des Kremastermuskels im unstimulierten Zustand sowie nach 30-minütiger Ischämie und anschließender 120-minütiger Reperfusion (**A**). Analyse der Fluoreszenzintensität von VTN in postkapillären Venolen des Kremastermuskels unstimuliert und nach I/R; MFI = Mittlere Fluoreszenzintensität (**B**; MW \pm SEM bei $n=4$ pro Gruppe; # $p < 0,05$ vs. unstimuliert)

5.1.2 Einfluss von VTN auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Peritonitismodell

In einer nächsten Versuchsreihe untersuchten wir den Einfluss von VTN auf die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs. Als geeignete Methode hierfür benutzten wir das Peritonitismodell. Drei Stunden nach Induktion einer Peritonitis mit den Chemokinen CCL2 bzw. CXCL1 (vgl. Kapitel 4.5.1.3) wurde die Anzahl der in die Peritonealhöhle eingewanderten Leukozyten durchflusszytometrisch quantifiziert. Die Leukozyten myeloiden Ursprungs ($CD45^+ CD11b^+$) konnten anhand des unterschiedlichen Expressionsmusters von Oberflächenmolekülen weiter untergliedert werden in neutrophile Granulozyten ($Gr-1^+ CD115^-$),

inflammatorische/klassische Monozyten ($\text{Gr-1}^+ \text{CD115}^+$) und nicht-klassische Monozyten ($\text{Gr-1}^- \text{CD115}^+$) (vgl. Abb. 10).

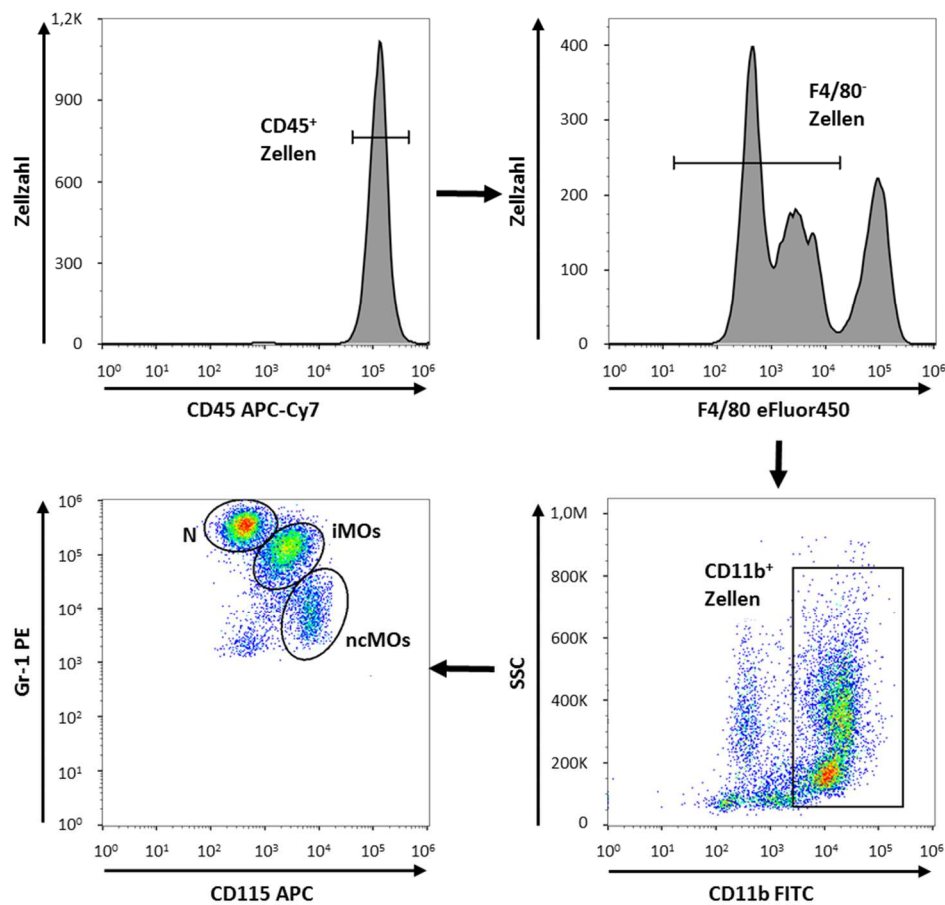


Abb. 10: Differenzierung der rekrutierten Leukozyten myeloiden Ursprungs – neutrophile Granulozyten (N), inflammatorische/klassische (iMOs) und nicht-klassische Monozyten (ncMOs) – anhand des Expressionsmusters immunphänotypischer Oberflächenmarker mithilfe der Durchflusszytometrie.

Durch Vergleich der Anzahl der rekrutierten Leukozyten in den verschiedenen Versuchsgruppen (WT, $\text{VTN}^{+/-}$, $\text{VTN}^{-/-}$) konnte der Einfluss von VTN auf die Extravasation der einzelnen Leukozytensubpopulationen ermittelt werden (vgl. Abb. 11). Im unstimulierten Zustand wanderten in allen Versuchsgruppen nur sehr wenige Immunzellen in die entzündete Peritonealhöhle aus. Die Anzahl der nicht-klassischen Monozyten blieb auch nach Stimulation in allen Versuchsgruppen auf konstant niedrigem Niveau (Daten nicht gezeigt). Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen/klassischen Monozyten stieg in WT-Tieren nach Stimulation mit CXCL1 und CCL2 stark an. Während die Anzahl der inflammatori-

schen/klassischen Monozyten in mit CXCL1 bzw. CCL2-stimulierten VTN-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren gleich blieb, änderte sich die Anzahl der rekrutierten neutrophilen Granulozyten deutlich. In den VTN-defizienten Mäusen waren signifikant weniger neutrophile Granulozyten in die entzündete Peritonealhöhle ausgewandert als in WT-Tieren. Dabei war der Effekt nach Stimulation mit CCL2 stärker ausgeprägt als nach Stimulation mit CXCL1. Die zwei Versuchsgruppen der VTN-defizienten Mäuse (VTN^{+/-}, VTN^{-/-}) unterschieden sich hinsichtlich der Anzahl der rekrutierten neutrophilen Granulozyten kaum voneinander.

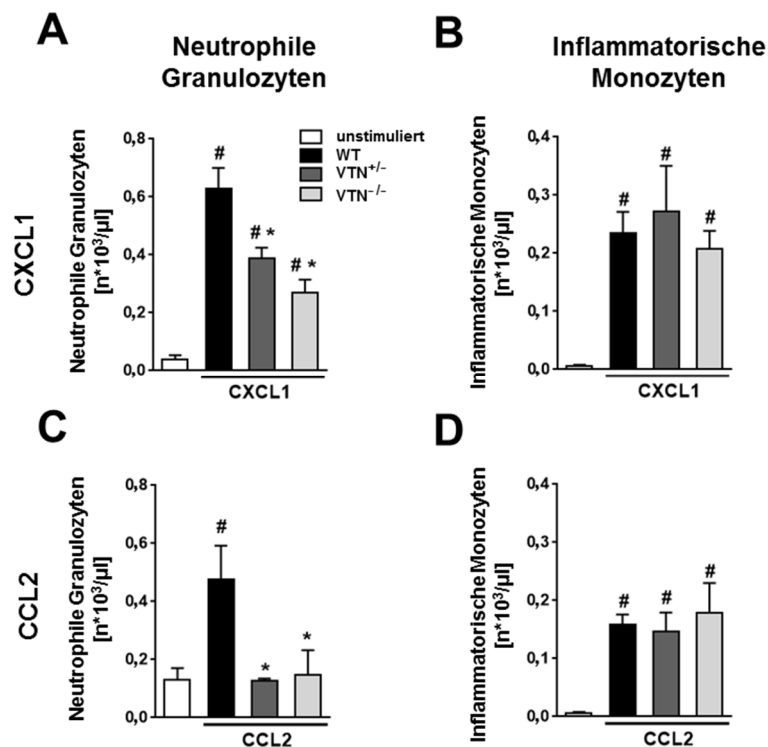


Abb. 11: Quantitative Analyse der in die Peritonealhöhle eingewanderten neutrophilen Granulozyten (**A+C**) und inflammatorischen/klassischen Monozyten (**B+D**) nach Stimulation mit den Chemokinen CXCL1 (**A+B**) bzw. CCL2 (**C+D**) in WT-Tieren sowie heterozygoten (VTN^{+/-}) und homozygoten (VTN^{-/-}) VTN-defizienten Mäusen (MW ± SEM bei n=4 pro Gruppe; # $p < 0,05$ vs. unstimuliert; * $p < 0,05$ vs. WT).

5.1.3 Bedeutung von VTN für die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung nach I/R des *M. cremaster*

Nachdem sich im Peritonitismodell ein signifikanter Einfluss von VTN auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten gezeigt hatte, untersuchten wir im Anschluss daran den Stellenwert von VTN für die einzelnen Schritte des Rekrutierungsprozesses dieser Immunzellen nach I/R. Nach Induktion einer 30-minütigen Ischämie und einer nachfolgenden 120-minütigen Reperusionsphase (vgl. Kapitel 4.5.2.3) in WT- und VTN^{-/-}-Mäusen wurden mittels IVM (vgl. Kapitel 4.5.2.5) die Interaktionen der Leukozyten mit Endothelzellen postkapillärer Venolen des Kremastermuskels beobachtet. Durch Visualisierung der neutrophilen Granulozyten mit fluoreszenzmarkierten, gegen Ly6G gerichteten, monoklonalen Antikörpern konnte der Anteil dieser rekrutierten Immunzellen an allen rekrutierten Leukozyten auf ca. 95 % berechnet werden (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen im Peritonitismodell übte VTN somit maßgeblich Einfluss auf den Rekrutierungsprozess von neutrophilen Granulozyten aus. Der fehlende Einfluss von VTN auf die Rekrutierung von inflammatorischen/klassischen und nicht-klassischen Monozyten ist ebenfalls bereits im Peritonitismodell gezeigt worden (vgl. Kapitel 5.1.2).

Die Parameter des leukozytären Rollens – die Anzahl der rollenden Leukozyten sowie die Rollgeschwindigkeit – nach I/R waren in VTN-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren nicht verändert (vgl. **Abb. 12 A, B**). Im Gegensatz dazu zeigten sich nach I/R signifikante Unterschiede in der Adhärenz von Leukozyten: Die Anzahl der fest adhärennten Zellen (> 30 Sekunden) war in VTN-defizienten Tieren deutlich geringer (vgl. **Abb. 12 D**). Während die Leukozyten in WT-Tieren eine mittlere Adhärenzzeit von knapp 30 Sekunden aufwiesen, adhärennten die Leukozyten in VTN-defizienten Mäusen im Mittel nur etwa 10 Sekunden lang am Gefäßendothel (vgl. **Abb. 12 E**). In diesem Sinn war die Anzahl der Leukozyten, die nur kurz am Endothel adhärennten (< 30 Sekunden), in VTN-defizienten Mäusen signifikant höher als in WT-Tieren (vgl. **Abb. 12 C**). Bereits in der IVM war die gestörte Adhärenz von neutro-

philen Granulozyten erkennbar: Die Unfähigkeit zur Ausbildung stabiler Kontakte mit dem Gefäßendothel zeigte sich in VTN-defizienten Tieren in einem „Rutschen“ dieser Immunzellen entlang des Gefäßendothels (**vgl. Abb. 13**). Ebenso unterschied sich der Parameter der Transmigration in den beiden Versuchsgruppen: In VTN-defizienten Mäusen waren nach I/R signifikant weniger Leukozyten in das Gewebe transmigriert (**vgl. Abb. 12 F**).

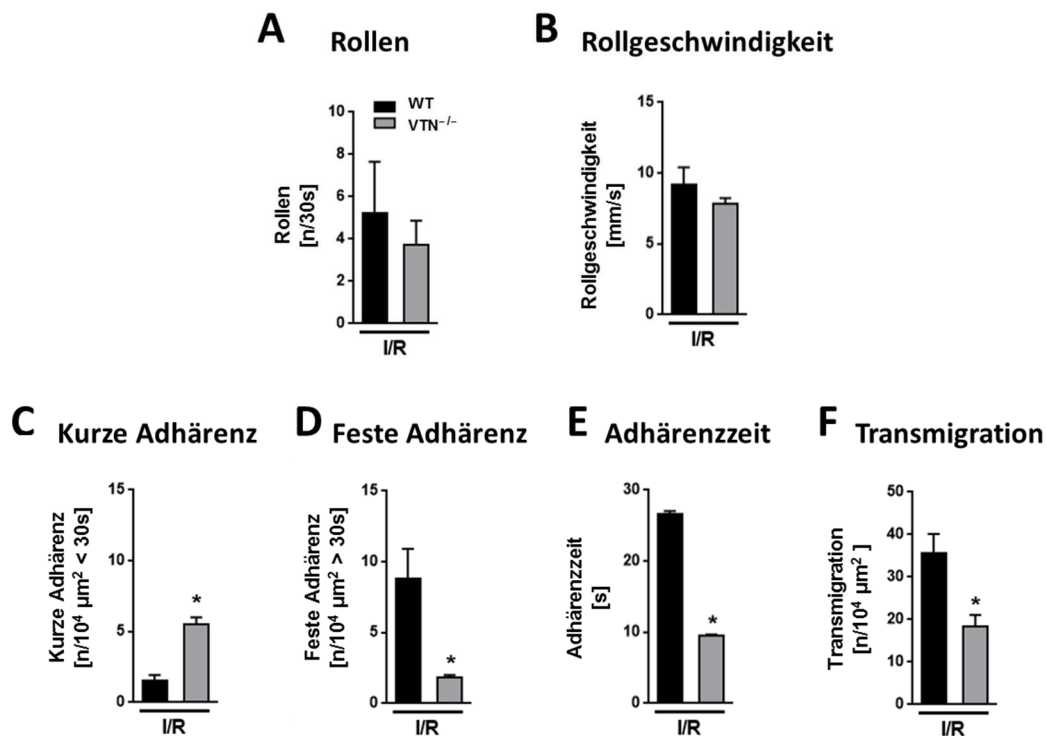


Abb. 12: Analyse des Rollens (**A**), der Rollgeschwindigkeit (**B**), der kurzen (**C**) sowie der festen Adhärenz (**D**), der mittleren Adhärenzzeit (**E**) und der Transmigration (**F**) von Leukozyten myeloiden Ursprungs (ca. 95 % neutrophile Granulozyten) in WT- sowie VTN-defizienten Tieren (MW ± SEM bei n=4 pro Gruppe; * p < 0,05 vs. WT).



Abb. 13: *In-vivo-Mikroskopie-Aufnahmen im Zeitraffer mit Visualisierung des intravaskulären „Abrutschens“ eines neutrophilen Granulozyten in einer postkapillären Venole einer VTN-defizienten Maus ($VTN^{-/-}$) (weißer Balken links unten: 10 μm ; rot: PE-markierte Ly6G⁺ neutrophile Granulozyten; weiße Pfeile: Weg eines rollenden neutrophilen Granulozyten).*

5.1.4 Bedeutung von VTN für die feste Adhärenz von Thrombozyten sowie für die Interaktion/ Kolokalisation von adhärenenten neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten nach I/R

Sodann wurde in einer nächsten Versuchsreihe untersucht, ob Thrombozyten einen Stellenwert in der VTN-vermittelten Extravasation von neutrophilen Granulozyten besitzen. Hierfür wurde *in vivo* der Einfluss von VTN auf die feste Adhärenz von Thrombozyten (**vgl. Abb. 14 A**) sowie auf das Interaktionsverhalten von adhärenenten neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten (**vgl. Abb. 14 B, C**) nach I/R mithilfe der IVM analysiert. Mittels geeigneter fluoreszenzmarkierter Antikörper wurden die neutrophilen Granulozyten (Ly6G⁺) sowie die Thrombozyten (GPIIb⁺) visualisiert. Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen gezeigt (**vgl. Kapitel 5.1.3**), war die Anzahl der fest adhärenenten neutrophilen Granulozyten nach einer 30-minütigen Ischämie und anschließenden 120-minütigen Reperfusionsphase in VTN-defizienten Mäusen signifikant geringer als in WT-Tieren (**vgl. Abb. 12 D und Abb. 14 A**). Im Gegensatz dazu unterschied sich die Anzahl der fest adhärenenten Thrombozyten in den beiden Versuchsgruppen nicht (**vgl. Abb. 14 A**). Ebenso war der Anteil an adhärenenten

neutrophilen Granulozyten, der mit den Thrombozyten interagierte bzw. kolokalisierte, in VTN-defizienten Tieren nahezu unverändert (vgl. **Abb. 14 B**).

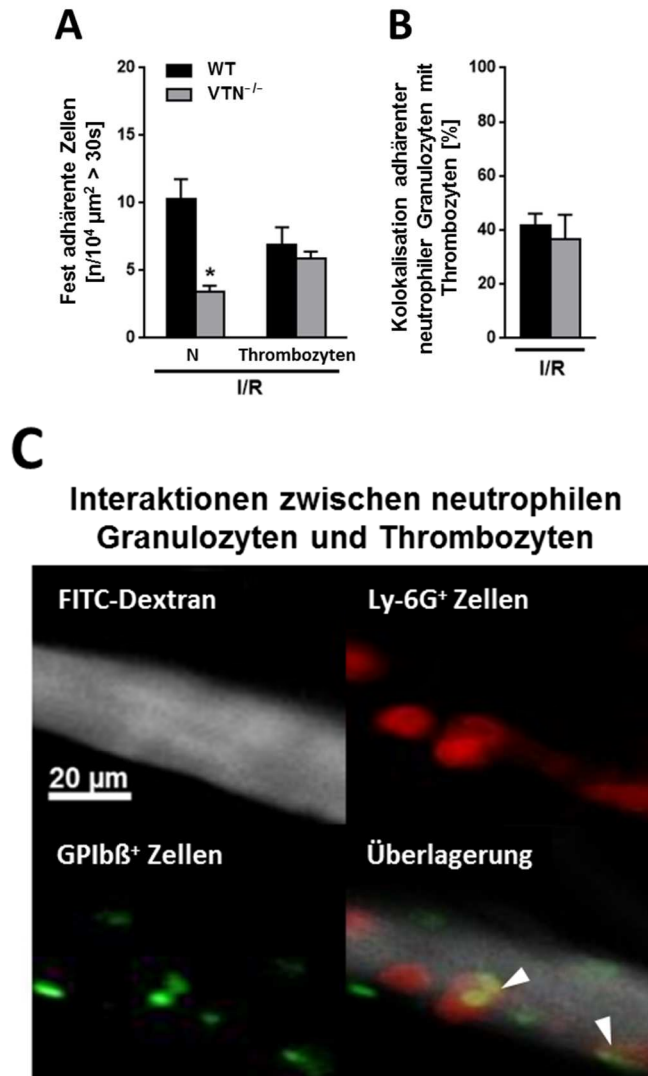


Abb. 14: Analyse der festen Adhärenz (**A**) sowie der Kolokalisation (**B**) von neutrophilen Granulozyten (N) und Thrombozyten in WT-Tieren und VTN-defizienten Mäusen (VTN^{-/-}) (jeweils MW ± SEM bei n=4 pro Gruppe; * p < 0,05 vs. WT). In-vivo-Mikroskopie-Aufnahmen nach I/R zur Analyse des Interaktionsverhaltens zwischen fest adhärenzten neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten am Gefäßendothel von postkapillären Venolen im Kremastermuskel einer WT-Maus (**C**; rot: PE-markierte Ly6G⁺ neutrophile Granulozyten; grün: DyLight 649-markierte GPIIb/IIIa⁺ Thrombozyten; gelb und weiße Pfeilspitzen: Kolokalisation zwischen adhärenzten neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten am Gefäßendothel; grau: mit FITC-Dextran visualisierte postkapilläre Venole im Kremastermuskel).

5.1.5 Bedeutung von VTN und Faktoren des fibrinolytischen Systems für die Konformation von $\beta 2$ -Integrinen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten

In weiteren Experimenten wurde der zugrundeliegende Mechanismus, über den VTN die Adhärenz und nachfolgende Transmigration von neutrophilen Granulozyten beeinflusst, weiter aufgeschlüsselt. Hierzu wurde der Einfluss von VTN, PAI-1, uPA sowie des VTN-PAI-1-Komplexes und des VTN-uPA-Komplexes auf die Konformation von $\beta 2$ -Integrinen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten *in vitro* untersucht. Unter Verwendung eines *Binding-Assays* konnte die Affinität von $\beta 2$ -Integrinen zu ihrem gemeinsamen Liganden ICAM-1 durchflusszytometrisch indirekt bestimmt und quantifiziert werden. VTN, PAI-1 und uPA sowie der Komplex aus VTN und uPA verursachten keine Veränderungen der Integrinaffinität. Im Gegensatz dazu kam es unter Stimulation mit dem VTN-PAI-1-Komplex zu einer verstärkten Bindung von ICAM-1 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten (vgl. Abb. 15).

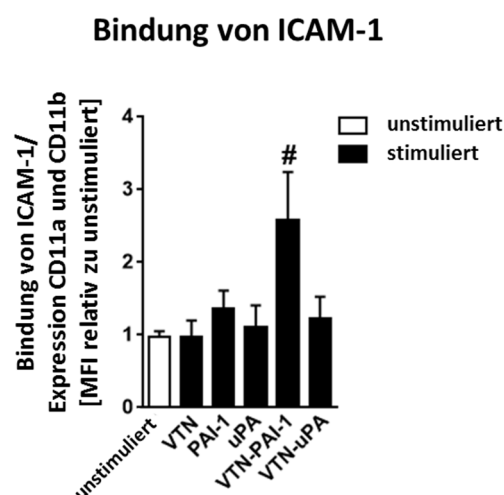


Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von VTN und Faktoren des Fibrinolyse-systems auf die Affinität von neutrophilen $\beta 2$ -Integrinen zum Liganden ICAM-1 (MW \pm SEM bei $n=6$ pro Gruppe; # $p < 0,05$ vs. unstimuliert).

Anschließend wurde mithilfe weiterer *Binding-Assays* versucht, Moleküle zu identifizieren, die in den Mechanismus der VTN-PAI-1-Komplex-vermittelten Affinitätssteigerung von neutrophilen β 2-Integrinen zu ICAM-1 involviert sind. Als potentiell mitwirkende Moleküle zogen wir LRP1, ein Bindungspartner von PAI-1, sowie die MAP-Kinasen in Betracht. In diesem Zusammenhang untersuchten wir, inwieweit RAP, ein LRP1-Inhibitor, sowie die Inhibitoren der MAP-Kinasen p38 (SB203580), JNK (SP600125) und ERK1/2 (FR180204) in der Lage waren, VTN-PAI-1-Komplex-vermittelte Affinitätsveränderungen von β 2-Integrinen auf neutrophilen Granulozyten zu unterbinden. Unter dem Einfluss von RAP kam es nach Stimulation mit dem VTN-PAI-1 Komplex zu einer signifikant verringerten Bindung von ICAM-1 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten. Des Weiteren zeigte sich nach Blockade der MAP-Kinase p38 ebenfalls keine Affinitätszunahme von neutrophilen β 2-Integrinen. Die Blockade der MAP-Kinasen JNK und ERK1/2 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die VTN-PAI-1-Komplex-vermittelte Aktivierung der β 2-Integrine (vgl. Abb. 16 A, B).

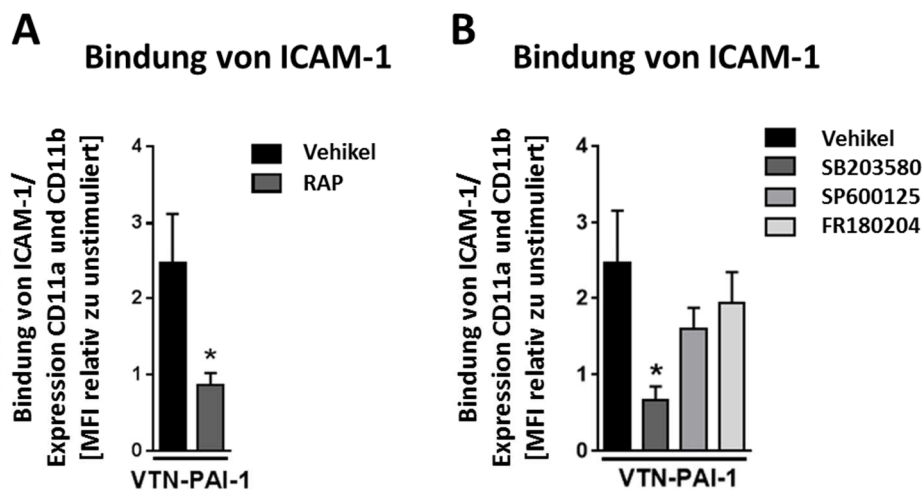


Abb. 16: Einfluss des RAP (A) und der MAP-Kinase-Inhibitoren SB203580 (p38-Inhibitor), SP600125 (JNK-Inhibitor) und FR180204 (ERK1/2-Inhibitor) (B) auf die verstärkte Bindung von ICAM-1 via Affinitätssteigerung der neutrophilen β 2-Integrine durch den VTN-PAI-1-Komplex (jeweils MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe; * p < 0,05 vs. Vehikel).

5.1.6 Expressionsanalyse von VTN und PAI-1 bzw. deren Komplex auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten

Da sich in den vorherigen Versuchen gezeigt hatte, dass der Komplex aus VTN und PAI-1 einen wesentlichen Einfluss auf die Affinität von $\beta 2$ -Integrinen hat, charakterisierten wir als Nächstes die Lokalisation dieser beiden Moleküle auf der Oberfläche von adhärenenten neutrophilen Granulozyten. Hierzu wurde die Expression von VTN und PAI-1 auf der Oberfläche der genannten Immunzellen in postkapillären Venolen des Kremastermuskels von WT-Tieren mithilfe der Konfokalmikroskopie visualisiert. Mittels immunhistochemischen Färbungen wurden VTN, PAI-1 und die neutrophilen Granulozyten (Ly6G⁺) markiert. VTN und PAI-1 befanden sich vorwiegend auf der dem Gefäßendothel zugewandten Oberfläche von neutrophilen Granulozyten. Im Sinne einer Komplexbildung zwischen VTN und PAI-1 überlagerte sich deren Expression häufig (vgl. **Abb. 17**).

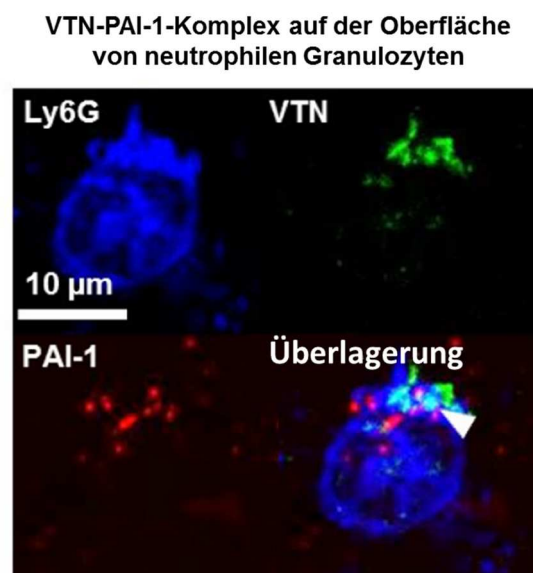


Abb. 17: Konfokalmikroskopische Untersuchung der Expression von VTN und PAI-1 auf der Oberfläche von adhärenenten neutrophilen Granulozyten im WT-Tier (dunkelblau: Ly6G⁺ neutrophile Granulozyten; grün: VTN; rot: PAI-1; lichtblau und weiße Pfeilspitze: Überlagerung bzw. Komplexbildung von VTN und PAI-1).

5.1.7 Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter

Die einzelnen Versuchsgruppen wurden hinsichtlich der systemischen Leukozytenzahlen und der mikrohämodynamischen Parameter – Gefäßinnendurchmesser, mittlere Blutfließgeschwindigkeit, Scherrate – auf ihre Vergleichbarkeit untersucht. Dabei ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den genannten Parametern.

	WT	VTN ^{-/-}
Mittlere		
Fließgeschwindigkeit	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,1
[mm/s]		
Gefäßinnen-Ø	25,5 ± 0,3	25,4 ± 0,7
[µm]		
Scherrate	1411,4 ± 70,6	1725,7 ± 163,4
[1/s]		
Systemische		
Leukozytenzahl	3,7 ± 0,3	3,5 ± 1,5
[*10³/µl]		

Tab 1: Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter.

5.2 Bedeutung des Chemokins CCL2 für die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Chemokins CCL2 auf die Rekrutierung von Leukozytenpopulationen myeloiden Ursprungs ermittelt und die Bedeutung dieses Chemokins für die Expression und Aktivität der leukozytären Integrine untersucht.

5.2.1 Einfluss von CCL2 und MAP-Kinasen auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Peritonitismodell

Im Peritonitismodell wurde zunächst der Einfluss des Chemokins CCL2 auf die Rekrutierung verschiedener Leukozytensubpopulationen untersucht. Nach Induktion einer Peritonitis durch eine sechsstündige intraperitoneale Stimulation mit CCL2 (vgl. Kapitel 4.5.1.3) kam es zu einem signifikanten Anstieg der in die Peritonealhöhle rekrutierten neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen/klassischen Monozyten, während sich die Anzahl der nicht-klassischen Monozyten nur unwesentlich veränderte (**vgl. Abb. 18 A, B, C**). Durch vorherige i.v.-Injektion der MAP-Kinase-Inhibitoren SB203580 (p38-Inhibitor), SP600125 (JNK-Inhibitor) oder FR180204 (ERK1/2-Inhibitor) wurde in weiteren Versuchsgruppen der Einfluss der genannten mitogenaktivierten Proteinkinasen auf die CCL2-vermittelte Rekrutierung der Leukozyten analysiert. Die Blockade von ERK1/2 (FR180204) und p38 (SB203580) führte zu einer verminderten Extravasation von inflammatorischen/klassischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten, wobei die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Falle der p38-Blockade deutlich, jedoch nicht signifikant verringert war. Die Blockade der MAP-Kinase JNK (SP600125) verhinderte die Migration von inflammatorischen/klassischen

Monozyten in die entzündete Peritonealhöhle, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (**vgl. Abb. 18 A, B**). Die Migration von nicht-klassischen Monozyten war durch Blockade der MAP-Kinasen nicht verändert (**vgl. Abb. 18 C**).

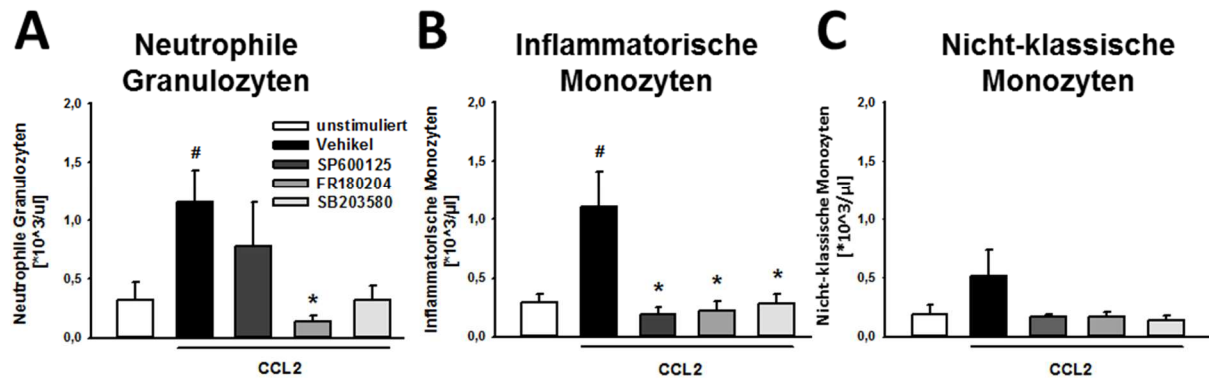


Abb. 18: Quantifizierung der in die Peritonealhöhle rekrutierten neutrophilen Granulozyten (A) sowie inflammatorischen/klassischen (B) und nicht-klassischen (C) Monozyten nach Stimulation mit CCL2 sowie Blockade der MAP-Kinasen p38 (SB203580), JNK (SP600125) oder ERK1/2 (FR180204) (MW \pm SEM bei $n=5-6$ pro Gruppe; # $p < 0,05$ vs. unstimuliert; * $p < 0,05$ vs. Vehikel).

5.2.2 Bedeutung von CCL2 für die Expression und Aktivität von β 1- und β 2-Integrinen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und Monozyten

In einer nächsten Versuchsreihe wurde der Stellenwert des Chemokins CCL2 für die Expression und Aktivität der β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 sowie des β 1-Integrins VLA-4 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und Monozyten untersucht. Die Stimulation mit CCL2 veränderte das mithilfe der Durchflusszytometrie ermittelte Expressionsniveau aller genannten Integrine nicht. Die sich daran anschließende Untersuchung der Konformation der leukozytären Integrine wurde unter Verwendung eines *Binding-Assays* indirekt bestimmt, indem die Bindung von ICAM-1 und VCAM-1 durchflusszytometrisch quantifiziert und die

ermittelten Werte ins Verhältnis zur Integrinexpression gesetzt wurden. Durch Stimulation mit PMA als Positivkontrolle kam es zu einer verstärkten Bindung von ICAM-1 und VCAM-1 auf der Oberfläche von inflammatorischen/klassischen Monozyten. Ebenso führte die Stimulation mit CCL2 zur Aktivierung der β 1-Integrine auf den genannten Immunzellen, wohingegen die Affinität der β 2-Integrine zu ihrem Liganden ICAM-1 nicht verändert war (vgl. **Abb. 19 A, B**). Die Aktivität von β 1- und β 2-Integrinen auf der Oberfläche von nicht-klassischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten veränderte sich durch Stimulation mit CCL2 nicht (Daten nicht gezeigt).

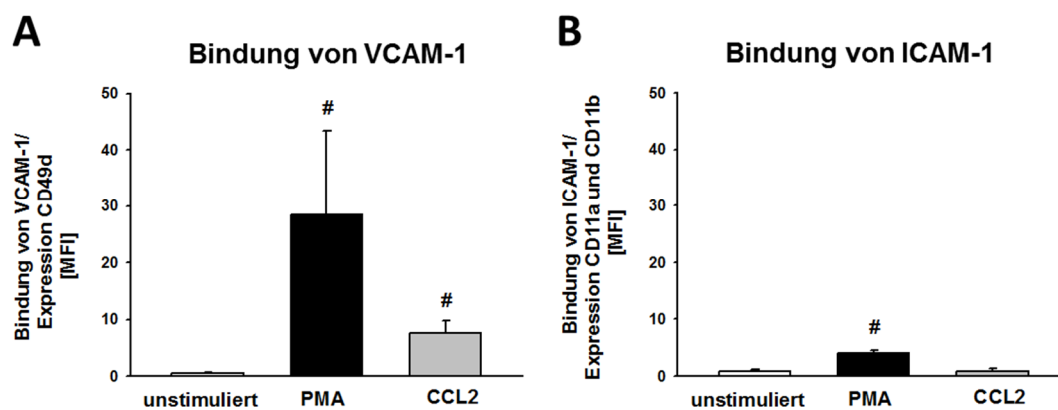


Abb. 19: Durchflusszytometrie-Diagramme, die den Einfluss des Chemokins CCL2 auf die Bindung von monozytären Integrinen an deren Liganden VCAM-1 (**A**) und ICAM-1 (**B**) zeigen (MW \pm SEM bei $n=4$ pro Gruppe; # $p < 0,05$ vs. unstimuliert).

6 Diskussion

6.1 Steuerung der Leukozytenrekrutierung

Die verstärkte Auswanderung von Leukozyten aus der Mikrovaskulatur in das Gewebe stellt ein wesentliches immunologisches Charakteristikum einer jeglichen Art von Entzündung dar. Nutzen kommt der Leukozytenextravasation dabei vor allem in der Bekämpfung eingedrungener Mikroorganismen, der Phagozytose abgestorbener Zellen, der Wundheilung im Falle einer Verletzung oder der Geweberegeneration im Falle des IRS zu. Der beschriebene Vorgang kann sich jedoch auch nachteilig auf den Organismus auswirken: Dies ist beispielsweise bei überschießenden Entzündungsreaktionen der Fall, die für chronisch-entzündliche Erkrankungen prädisponieren oder bei Immunreaktionen gegen eigentlich harmlose Antigene und körpereigene Antigene, die mit allergischen Erkrankungen bzw. Autoimmunerkrankungen einhergehen. Auch beim IRS trägt die Freisetzung von Proteasen und freien Sauerstoffradikalen durch neutrophile Granulozyten zunächst zu einer Verschlimmerung des bereits bestehenden ischämisch-bedingten Gewebeschadens bei ^{26, 57, 46, 58, 6, 53}.

Das angeborene Abwehrsystem wird zu Beginn einer akuten inflammatorischen Antwort aktiviert und ist in der Lage, binnen sehr kurzer Zeit auf Veränderungen des Körpers (z.B. eingedrungene Mikroorganismen) zu reagieren. Die neutrophilen Granulozyten gehören dabei zu den ersten Immunzellen, die an den Ort der Entzündung rekrutiert werden, gefolgt von den inflammatorischen/klassischen Monozyten, die etwas verzögert agieren ¹¹⁶. Die Auswanderung der Leukozyten folgt dabei einem kaskadenartig ablaufenden Rekrutierungsprozess. Die einzelnen Schritte dieses Prozesses (Einfangen der Leukozyten, Rollen, Adhärenz, intravaskuläres Kriechen, Transmigration) wurden in den vergangenen Jahrzehnten beschrieben und genauer charakterisiert. Die Migration der Leukozyten aus dem mikrovas-

kulären Stromgebiet in das Gewebe wird dabei von einer Reihe an Faktoren und Molekülen reguliert, deren Zusammenspiel wesentlich für eine erfolgreiche Immunantwort ist. Bedeutend sind in diesem Zusammenhang vor allem Zelladhäsionsmoleküle (**vgl. Abb. 20**), wie Selektine, Integrine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und Cadherine, sowie Zytokine^{229, 4, 113}. Dass es im detaillierten Verständnis dieses komplexen Zusammenspiels, das zudem situations- und zelltypspezifisch ist, bis heute viele Lücken gibt, ist nicht verwunderlich. So sind zahlreiche molekulare Mechanismen im Rekrutierungsprozess verschiedener Leukozytensubpopulationen bei unterschiedlichsten Immunantworten (z.B. bakterielle oder virale Infektion, I/R) bisher unzureichend verstanden. Wissenslücken bestehen vor allem auch hinsichtlich intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse, die durch Bindung von Adhäsions- oder Signalmolekülen an deren Rezeptoren ausgelöst werden und aufgrund ihrer Komplexität bisher nicht im Detail aufgeschlüsselt wurden^{230, 119}.

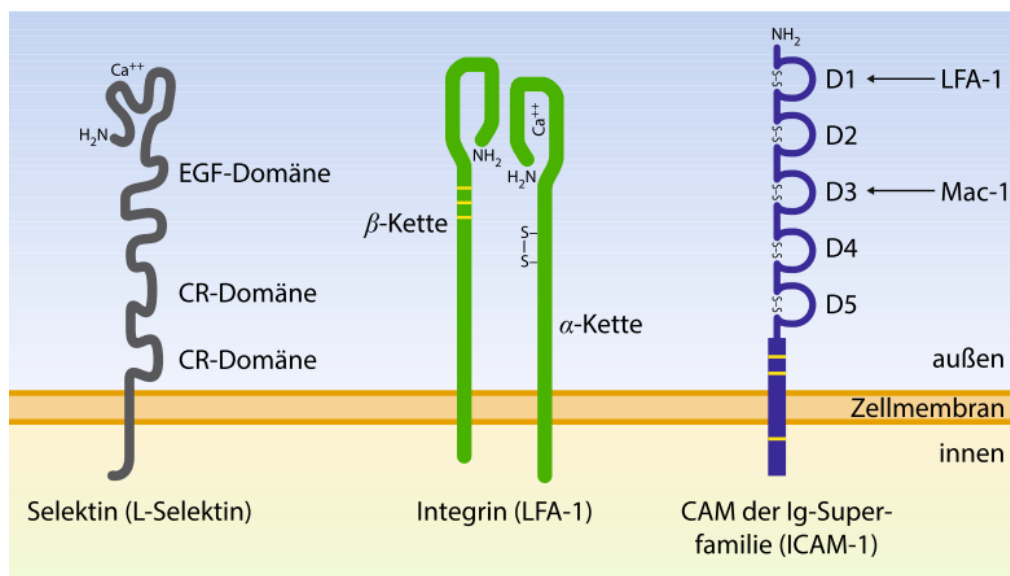


Abb. 20: Schematische Darstellung des Aufbaus der Zelladhäsionsmoleküle Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Abkürzungen: CAM (cell adhesion molecule); EGF (epidermal growth factor)-ähnliche Domäne; CR (consensus repeat)-Domäne (nach 4)

6.1.1 Selektine

Selektine vermitteln den ersten Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Gefäßendothel und sind wesentlich an leukozytären Rollen entlang der Gefäßwand beteiligt ^{121, 229}. Anhand der N-terminalen lektinähnlichen Domäne (**vgl. Abb. 20**) werden drei Mitglieder der Selektinfamilie unterschieden: P-Selektin (CD62P), L-Selektin (CD62L) und E-Selektin (CD62E) ⁴. P-Selektin kommt in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen sowie in den α -Granula der Thrombozyten vor und wird bei Aktivierung dieser Zellen innerhalb von Sekunden bis Minuten an die Zelloberfläche transloziert ¹²¹. Dagegen wird E-Selektin von aktivierten Endothelzellen neu synthetisiert und wird somit erst einige Stunden nach Stimulation auf der Zelloberfläche exprimiert ⁴. L-Selektin wird als einziges Selektin auf der Oberfläche zirkulierender Leukozyten exprimiert ^{4, 121}.

Die Funktionen dieser Glykoproteine werden durch Interaktionen mit Kohlenhydratketten von Muzin-ähnlichen Molekülen auf der Oberfläche von Leukozyten oder Endothelzellen vermittelt ^{72, 121}. Beispiele für Interaktionspartner von Selektinen sind PSGL-1, CD44, ESL-1, CD34 und GlyCAM-1 ^{121, 4, 231}.

6.1.2 Integrine

Integrine vermitteln Interaktionen zwischen Zellen untereinander sowie zwischen Zellen und der EZM ²³². Im Rekrutierungsprozess der Leukozyten tragen sie wesentlich zur Stabilisierung der leukozytären Kontakte mit Endothelzellen bei ^{72, 230}. Integrine sind an beinahe jedem Schritt in der leukozytären Rekrutierungskaskade beteiligt, insbesondere am langsamen Rollen, der festen Adhärenz, dem intravaskulären *Crawling* sowie der Transmigration ^{230, 113}. Strukturell gesehen sind Integrine Glykoproteine bestehend aus einer α - und einer β -Kette,

die nicht-kovalent miteinander verbunden sind (**vgl. Abb. 20**)^{233, 4}. Durch Kombination verschiedener α - und β -Ketten werden im menschlichen System mindestens 24 Integrin-Heterodimere gebildet^{233, 234, 232}. An der Extravasation von neutrophilen Granulozyten sind maßgeblich die $\beta 2$ -Integrine LFA-1 und Mac-1 beteiligt, an der Migration der inflammatorischen/klassischen Monozyten zusätzlich das $\beta 1$ -Integrin VLA-4 (**vgl. Abb. 21**)²³⁰. Diese Integrine befinden sich auf der Oberfläche der entsprechenden Leukozytensubpopulationen und können nach Chemokin-vermittelter Aktivierung derselben mit endothelial exprimierten Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie interagieren^{235, 236}. Dabei binden die $\beta 2$ -Integrine LFA-1 und Mac-1 hauptsächlich an ICAM-1 und ICAM-2, das $\beta 1$ -Integrin VLA-4 hingegen vorwiegend an VCAM-1^{237, 230, 123, 112}. Weitere Interaktionspartner der leukozytären Integrine sowie ihr Expressionsmuster auf den verschiedenen Leukozytensubpopulationen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Abbildung 21 gibt eine grobe Übersicht über die an den einzelnen Schritten der Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten beteiligten Integrine.

Integrin		Expression	Liganden
LFA-1 (CD11a/CD18)	$\alpha_L\beta_2$	Lymphozyten Neutrophile Monozyten Dendritische Zellen NK-Zellen	ICAM-1, 2, 3, 4, 5 JAM-A
Mac-1 (CD11b/CD18)	$\alpha_M\beta_2$	Neutrophile Monozyten Makrophagen Dendritische Zellen Lymphozyten NK-Zellen	ICAM-1, 2, 4 Fibrinogen iC3b u.a.
VLA-4 (CD49d/CD29)	$\alpha_4\beta_1$	Lymphozyten Monozyten Eosinophile NK-Zellen Neutrophile (minimal)* Nicht-immunologische Zellen	VCAM-1 Fibronectin JAM-B

Tab 2: Expression und Liganden der leukozytären Integrine LFA-1, Mac-1 und VLA-4; * vgl. ²³⁸ (modifiziert nach ¹²³ und ⁷²).

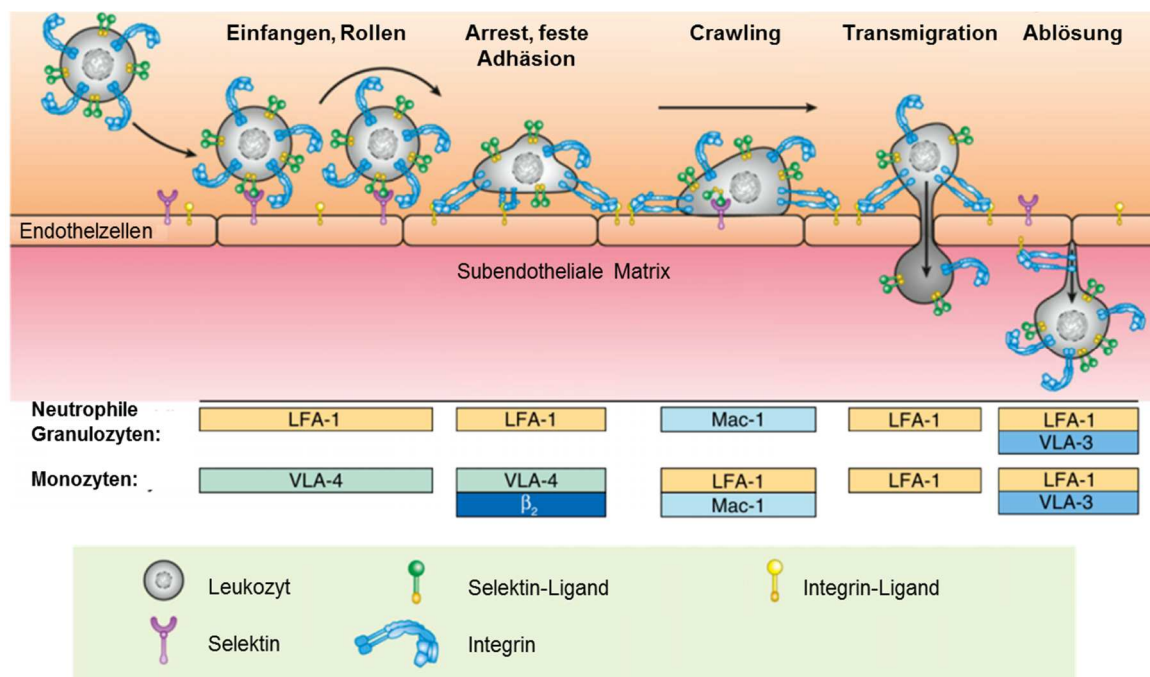


Abb. 21: Schematische Darstellung der beteiligten Integrine an den einzelnen Schritten des Rekrutierungsprozesses von neutrophilen Granulozyten und Monozyten (modifiziert nach ²³⁰).

In Gegenwart verschiedener Entzündungsmediatoren, z.B. bestimmter Zytokine, kann das Expressionsniveau von leukozytären Integrinen hochreguliert werden ^{239, 240, 241}. Integrine sind jedoch – im Gegensatz zu Selektinen – nicht konstitutiv aktiv ⁴. Sie können in unterschiedlichen Konformations- bzw. Aktivitätszuständen vorliegen, welche die Affinität zu ihren Liganden bestimmen. In diesem Zusammenhang unterscheidet man primär eine „gebeugte“ Konformation von einer „gestreckten“ Form mit entweder intermediärer oder offener Konformation ^{119, 230}. Integrine in „gebeugter“ Konformation befinden sich vorwiegend auf ruhenden, nicht-aktivierten Zellen und besitzen eine niedrige Affinität für Liganden ²³⁰. Die intermediäre Konformation kann durch Bindung von Selektinen (z.B. P- und E-Selektin) an deren Liganden auf der Oberfläche von Leukozyten (z.B. PSGL-1, CD44) induziert werden und ist vorwiegend für das langsame Rollen der Leukozyten bedeutend ^{242, 119, 243}. Die Bindung von Chemokinen an die leukozytär exprimierten Chemokinrezeptoren kann neben der intermediären auch die offene Konformation von Integrinen induzieren. In dieser Konformation sind die Integrine in der Lage, mit hoher Affinität an ihre Liganden, den endothelial exprimierten

Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie, zu binden und spielen eine wichtige Rolle für die feste Adhärenz, das intraluminale *Crawling* sowie für die transendotheliale Migration der Leukozyten^{230, 123, 244, 119, 245, 246, 247, 248, 249, 235}. Die Selektin- bzw. Chemokin-vermittelte Konformationsänderung der Integrine hin zu einer „gestreckten“ intermediären bzw. offenen Konformation wird durch das sogenannte „inside-out signaling“ hervorgerufen und kann sehr schnell erfolgen. An den verschiedenen Signaltransduktionsprozessen sind eine Reihe intrazellulärer Signalmoleküle (z.B. Tyrosinkinasen, GTPasen) beteiligt (vgl. Abb. 22), wobei die genauen Mechanismen für einige Integrine noch nicht vollständig aufgeschlüsselt sind^{119, 235,}

234.

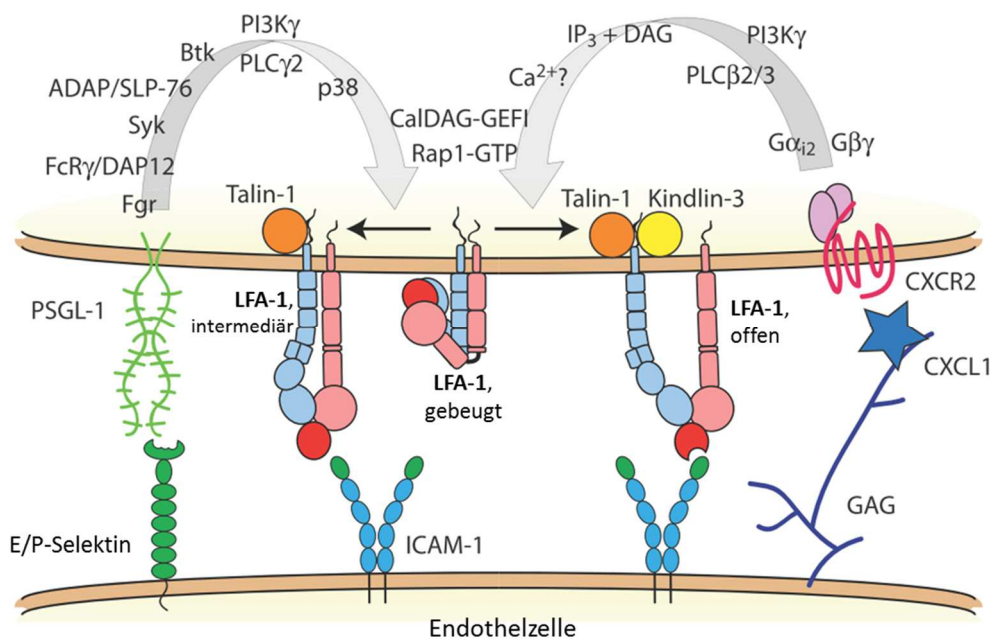


Abb. 22: Aktivierung von LFA-1 durch „inside-out signaling“ in neutrophilen Granulozyten: Die Bindung von E-/P-Selektin an den leukozytären Selektinliganden PSGL-1 führt über intrazelluläre Signalwege zur Konformationsänderung des $\beta 2$ -Integrins LFA-1 hin zu einer intermediären, „extended“ Konformation. Die Bindung des endothelial präsentierten Chemokins CXCL1 an den Chemokinrezeptor CXCR2 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten induziert die offene, hoch-affine Konformation von LFA-1. Abkürzungen: Fgr (feline Gardner-Rasheed sarcoma kinase); FcR γ (immunoglobulin gamma Fc receptor); DAP12 (DNAX activating protein of 12 kDa); Syk (spleen tyrosine kinase); ADAP (adhesion and degranulation promoting adaptor protein); SLP-76 (SH2 domain-containing leucocyte phosphoprotein of 76 kDa); Btk (Bruton tyrosine kinase); PI3K (phosphoinositide 3-kinase); PLC (phospholipase C); IP₃ (inositol triphosphate); DAG (diacylglycerol); CalDAG-GEFI (calcium- and diacylglycerol-regulated guanine nucleotide exchange factor I) (modifiziert nach¹¹⁹).

Im Gegensatz zum „inside-out signaling“ beschreibt das „outside-in signaling“ die durch Integrin-Liganden-Bindung ausgelösten intrazellulären Signaltransduktionsprozesse. Dadurch können diverse Zellfunktionen beeinflusst werden wie beispielsweise die Degranulation von neutrophilen Granulozyten sowie deren Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und die Differenzierung von Makrophagen²³⁴. Die am „outside-in signaling“ beteiligten Signalmoleküle sind teils identisch mit denen des „inside-out signaling“, teils jedoch verschieden, wobei auch hier die genauen Mechanismen noch nicht im Detail aufgeschlüsselt sind^{234, 230}. Studien der letzten Jahre geben konkrete Hinweise darauf, dass auch MAP-Kinasen in Signalwege des „inside-out“- und „outside-in signaling“ involviert sind und somit auch eine Rolle im Extravasationsprozess von Leukozyten spielen^{250, 251, 252, 253}.

6.1.3 Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie

Für die Extravasation von Leukozyten sind insbesondere die endothelial exprimierten Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie – ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1, JAM-A, JAM-B, JAM-C und ESAM – bedeutend^{113, 112}. Die Expression dieser Transmembranproteine auf der Oberfläche von Endothelzellen erfolgt entweder konstitutiv oder wird durch Entzündungsmediatoren hochreguliert^{4, 254}. Während die β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 vorwiegend mit ICAM-1 und ICAM-2 interagieren, bindet das β 1-Integrin VLA-4 hauptsächlich an VCAM-1^{123, 230, 237, 112}.

6.1.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine, sogenannte chemotaktische Zytokine, sind Signalmoleküle, die in erster Linie für zielgerichtete Migrationsbewegungen bedeutend sind. Sie werden nach ihrer cysteininhaltigen Aminosäuresequenz am Aminoterminal in vier Familien untergliedert: Bei den CC-Chemokinen liegen die ersten zwei Cysteine am N-Terminus direkt nebeneinander, wohingegen sie bei den CXC- bzw. CX₃C-Chemokinen durch eine bzw. drei Aminosäuren voneinander getrennt sind. Die C-Chemokine sind im Gegensatz dazu mit nur einem konservierten Cystein am N-Terminus ausgestattet, was die Ausbildung einer – anstelle von zwei oder drei – Disulfidbrücken zur Folge hat ^{255, 4, 256}. Eine vereinfachte Darstellung der Struktur der verschiedenen Chemokinfamilien mit einer Auswahl an entsprechenden Vertretern zeigt Abbildung 23.

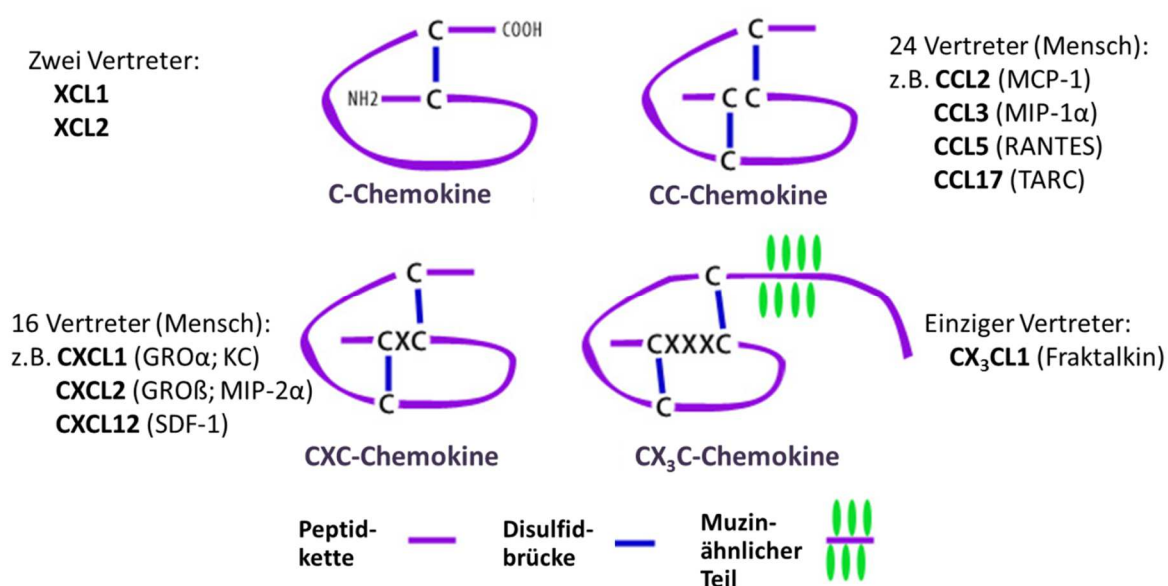


Abb. 23: Schematische Darstellung des Aufbaus der vier Chemokinfamilien mit Beispielen an entsprechenden Mitgliedern (modifiziert nach ²⁵⁷).

Chemokine sind mit 60 - 100 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 8 - 14 kDa relativ kleine Proteine, die von verschiedenen Zellen – unter anderem von Leukozyten, Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten – sezerniert werden ^{255, 258, 259}. Dabei liegen die Chemokine entweder frei (z.B. im Blut gelöst) oder über GAG an Gewebestrukturen (z.B. Endothel, Proteine der EZM) gebunden vor ^{260, 261, 262, 113}. Chemokine können konstitutiv, sogenannte homöostatische Chemokine, und/oder als Reaktion auf inflammatorische Stimuli, wie Interleukin-1 (IL-1), IFN- γ und TNF, von aktivierten Zellen synthetisiert werden ^{4, 263, 261}. Letztere, die sogenannten inflammatorischen oder induzierbaren Chemokine, sind im Rahmen entzündlicher Prozesse v.a. für die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Gewebeschädigung oder Infektion bedeutend ^{4, 261}. In diesem Zusammenhang vermitteln sie durch Interaktion mit entsprechenden Chemokinrezeptoren und nachfolgender Aktivierung von Integrinen die feste Adhärenz der Immunzellen nachdem diese am Gefäßendothel entlanggerollt sind ¹¹³. Durch Aktivierung von Leukozyten vermögen Chemokine auch deren Abwehrfunktion zu beeinflussen: CXCL8 beispielsweise kann die Degranulation von neutrophilen Granulozyten und CCL2 den oxidativen Burst von Monozyten auslösen ^{264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271}. Verschiedene Chemokine können die Migration bestimmter Leukozytensubpopulationen medieren. Während der Gruppe der CXC-Chemokine vor allem Bedeutung in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zukommt, werden CC-Chemokine häufig als klassische Vermittler der Extravasation von Monozyten angesehen ²⁷². Einige neuere Studien geben jedoch konkrete Hinweise darauf, dass unter *In-vivo*-Bedingungen manche CC-Chemokine neben Monozyten auch neutrophile Granulozyten mobilisieren und umgekehrt Vertreter der CXC-Chemokine auch die Adhärenz von Monozyten vermitteln können ^{273, 274, 275, 276, 277, 278, 279}. Eine strikte funktionelle Trennung dieser beiden Chemokinfamilien erscheint in dieser Hinsicht nicht gänzlich zutreffend. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die durch verschiedene Chemokinfamilien aktivierten bzw. rekrutierten Leukozytensubpopulationen.

Chemokinfamilie (Anzahl)	Spezifische Rezeptoren (Anzahl)	Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunabwehr	Aktivierung von Zellen der erworbenen Immunabwehr
CCL (28)	CC-Rezeptoren (CCR 1-10)	Monozyten Makrophagen Neutrophile Eosinophile Basophile NK-Zellen	Dendritische Zellen T-Lymphozyten B-Lymphozyten
CXCL (17)	CXC-Rezeptoren (CXCR 1-7)	Neutrophile Eosinophile Basophile Monozyten Makrophagen NK-Zellen	Dendritische Zellen T-Lymphozyten B-Lymphozyten
CX ₃ CL (1)	CX ₃ C-Rezeptor (CX ₃ CR1)	Neutrophile Monozyten Makrophagen	T-Lymphozyten
XCL (2)	XC-Rezeptor (XCR1)	NK-Zellen	Thymus-Lymphozyten

Tab 3: Chemokinfamilien, zugehörige Rezeptoren und Zellaktivierungsmuster (modifiziert nach ²⁶³)
(Anmerkung: nicht jeder Vertreter einer Chemokinfamilie aktiviert jede der aufgeführten Leukozyten-subpopulation).

Konstitutive bzw. homöostatische Chemokine besitzen unter anderem Bedeutung für das „Homing“ von Stammzellen (z.B. während der Embryogenese), für die Hämatopoese, die Auswanderung von Leukozyten aus dem Knochenmark und die Lymphozytenentwicklung im Thymus ^{263, 280, 258, 99}. Darüber hinaus beteiligen sich Chemokine an Prozesse der Wundheilung und Angiogenese ^{255, 281}. Eine ungehemmte Expression von Chemokinen bzw. deren Rezeptoren wird in Zusammenhang mit einer Reihe von chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Malignomen beobachtet. So geht die Psoriasis mit einer erhöhten Expression des Chemokins *liver activation regulated chemokine* (CCL20, LARC) und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn) mit einer erhöhten Expression der Chemokine CCL2, CCL20, CXCL8 und *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted* (CCL5, RANTES) einher ^{282, 283}. Die erhöhte Expression des Chemokinrezeptors

CCR6 auf Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms ist wiederum mit einem vermehrten Auftreten von Lebermetastasen assoziiert ²⁸⁴. Aber auch in die Pathogenese des IRS scheinen Chemokine sowie deren Rezeptoren involviert zu sein. In diesem Zusammenhang konnten nach I/R der Niere erhöhte Expressionsprofile der Chemokine CCL2, CXCL1, *growth related oncogene-β* (CXCL2, GROβ) und *thymus and activation regulated chemokine* (CCL17, TARC) sowie der Chemokinrezeptoren CCR1 und CX₃CR1 nachgewiesen werden ^{285, 286}. Insofern stellen Chemokine und deren Rezeptoren mögliche Angriffspunkte für neue Therapiekonzepte dar ²⁵⁵. Ihren Einfluss auf die Umgebung üben Chemokine vorwiegend über die Bindung an bestimmte Chemokinrezeptoren aus. Dabei bestehen innerhalb einer Chemokinfamilie und der entsprechenden Rezeptorgruppe (CCR, CXCR, CX₃CR, XCR) häufig mehrere Interaktionsmöglichkeiten ⁴. Chemokinrezeptoren sind Mitglieder der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und leiten nach Andocken eines passenden Chemokinliganden das Signal über heterotrimäre G-Proteine in das Zellinnere weiter. Die intrazelluläre Signalkaskade beinhaltet unter anderem die Freisetzung von Kalzium, Aktivierung der Phospholipase C sowie GTPasen und MAP-Kinasen ²⁵⁵. Wie bereits erwähnt, sind – ebenso wie Chemokine – auch die Rezeptoren in die Pathogenese verschiedener Krankheitsbilder involviert. Besonderes Forschungsinteresse liegt gegenwärtig bei den Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4, die als Korezeptoren für das Eindringen des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) in die Wirtszelle fungieren ^{259, 4}.

Das **Chemokin CCL2** ist ein Repräsentant der CC-Chemokin-Familie und ein potenter Stimulus für die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Entzündung. Als klassisches Signalmolekül für inflammatorische/klassische Monozyten ist CCL2 an deren Extravasation maßgeblich beteiligt ²⁵⁸. Darüber hinaus kann CCL2 aber auch natürliche Killerzellen, CD4-positive T-Gedächtniszellen sowie – gemäß einigen neueren Studien – auch neutrophile Granulozyten rekrutieren ^{258, 274}. Der Chemokinrezeptor CCR2 auf der Oberfläche dieser Leukozyten fungiert dabei als Interaktionspartner für endothelial gebundenes CCL2 ^{287, 258, 288, 289, 290}. Eine Reihe von Zellen sind in der Lage CCL2 zu synthetisieren und zu sezernieren,

unter anderem Monozyten/Makrophagen und Endothelzellen ^{258, 291}. Dabei erfolgt die Synthese entweder konstitutiv oder als Antwort auf eine Gewebeschädigung bzw. Infektion, getriggert durch Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder oxidativer Stress ²⁵⁸. Auch CCL2 spielt eine Rolle in der Pathogenese einer Vielzahl von Krankheitsbildern, darunter vaskuläre (z.B. Atherosklerose, diabetische Retinopathie), entzündliche, autoimmune, allergische und infektiöse Erkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, allergisches Asthma, Uveitis, HIV), sowie Tumorerkrankungen (z.B. Mamma- und Magenkarzinom) ^{292, 293, 288, 294, 295, 258, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307}. Aber auch in die Pathogenese des IRS ist CCL2 involviert: In der Niere konnte nach I/R eine verstärkte Expression von CCL2 nachgewiesen werden, die mit einer gesteigerten Infiltration von Monozyten/Makrophagen in das postischämische Gewebe einherging ^{286, 285}. CCL2-defiziente Mäuse zeigten in einer frühen Phase nach I/R der Niere einen ausgedehnteren Nierenschaden mit einem verstärkten Ausmaß an tubulärer Apoptose sowie einer erhöhten Mortalitätsrate im Vergleich zu WT-Tieren. Demnach scheint das Chemokin CCL2 einen protektiven Effekt auf den durch I/R bedingten Nierenschaden auszuüben ³⁰⁸.

6.1.5 Mitogenaktivierte Proteinkinasen

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) sind kleine intrazelluläre Proteinkinasen, die in eine Reihe von Signaltransduktionsmechanismen integriert sind. Drei unterschiedliche MAP-Kinase-Signalwege sind besonders gut dokumentiert, nämlich die p38-MAP-Kinase-Kaskade, die JNK- sowie die ERK1/2-Kaskade. Die MAP-Kinasen stehen dabei am Ende einer Abfolge aus mindestens drei Kinasen, die nacheinander durch Phosphorylierung aktiviert werden. Eine MAP-Kinase wird ihrerseits durch die MAP-Kinase-Kinase (MAP-2K) phosphoryliert, die wiederum von einer MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP-3K) aktiviert wurde

309, 310, 311, 312. Einen Überblick über die Hauptkomponenten der drei genannten MAP-Kinase-Kaskaden gibt Abbildung 24.

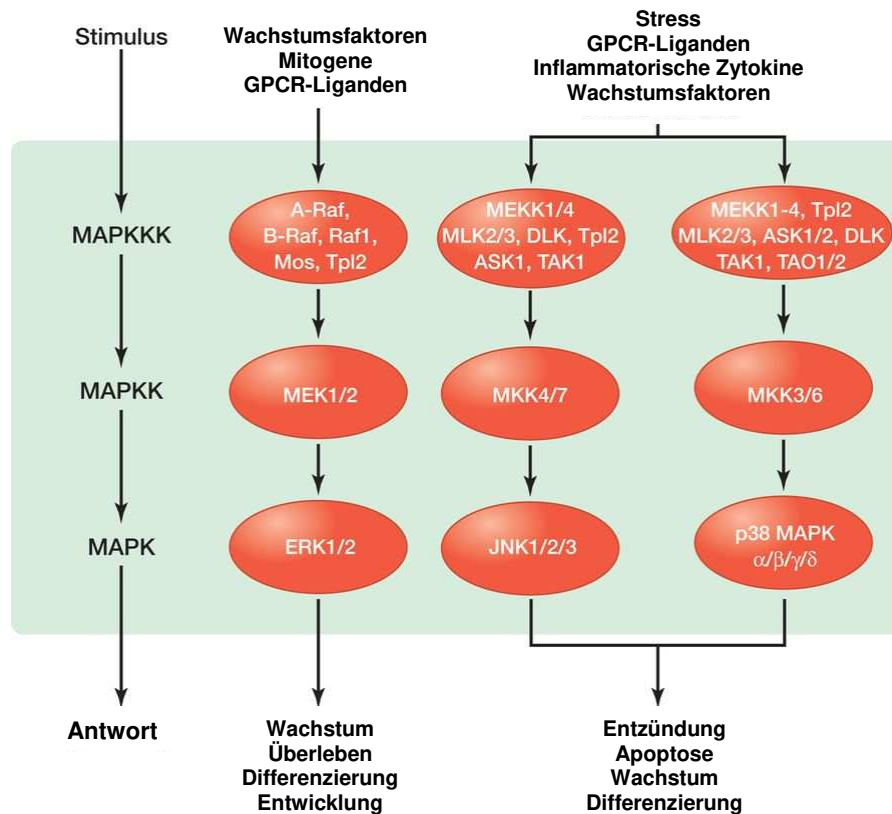


Abb. 24: MAP-Kinase-Signalwege (modifiziert nach ³¹³)

Die MAP-Kinase-Signalwege sind an der Regulation verschiedenster zellulärer Abläufe und Funktionen beteiligt, die teils relativ spezifisch für einen Signalweg sind, sich teils aber auch überlappen. In erster Linie spielen sie eine bedeutende Rolle für Zellwachstum, Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Darüber hinaus sind sie in Prozesse der Embryogenese, des programmierten Zelltodes (Apoptose) sowie in Entzündungsvorgänge involviert ^{311, 310, 309, 312}. Aktivierte MAP-Kinasen können durch Phosphorylierung von Serin- oder Threonin-Resten zelluläre Proteine, nachgeschaltete Kinasen und Transkriptionsfaktoren aktivieren. Angeschaltete Transkriptionsfaktoren können wiederum die Expression von Zielgenen im Zellkern initiieren ^{312, 310, 311, 313, 309}. Die Aktivierung einer Kinase-Kaskade kann durch eine Reihe

extrazellulärer Reize erfolgen, unter anderem durch Mitogene (z.B. *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor* (EGF), Insulin, Schilddrüsenhormone), proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF, IL-1), bakterielle Endotoxine und oxidativen Stress^{314, 315, 316, 317, 318, 313, 311, 312, 319}. Ein Beispiel für die Aktivierung der ERK1/2-Kaskade durch PDGF stellt Abbildung 25 dar. Auch im Rahmen entzündlicher Vorgänge kommt es zur Aktivierung von MAP-Kinasen^{312, 319}. In diesem Zusammenhang rücken sie zunehmend vor dem Hintergrund der Leukozytenaktivierung und -rekrutierung ins Rampenlicht.

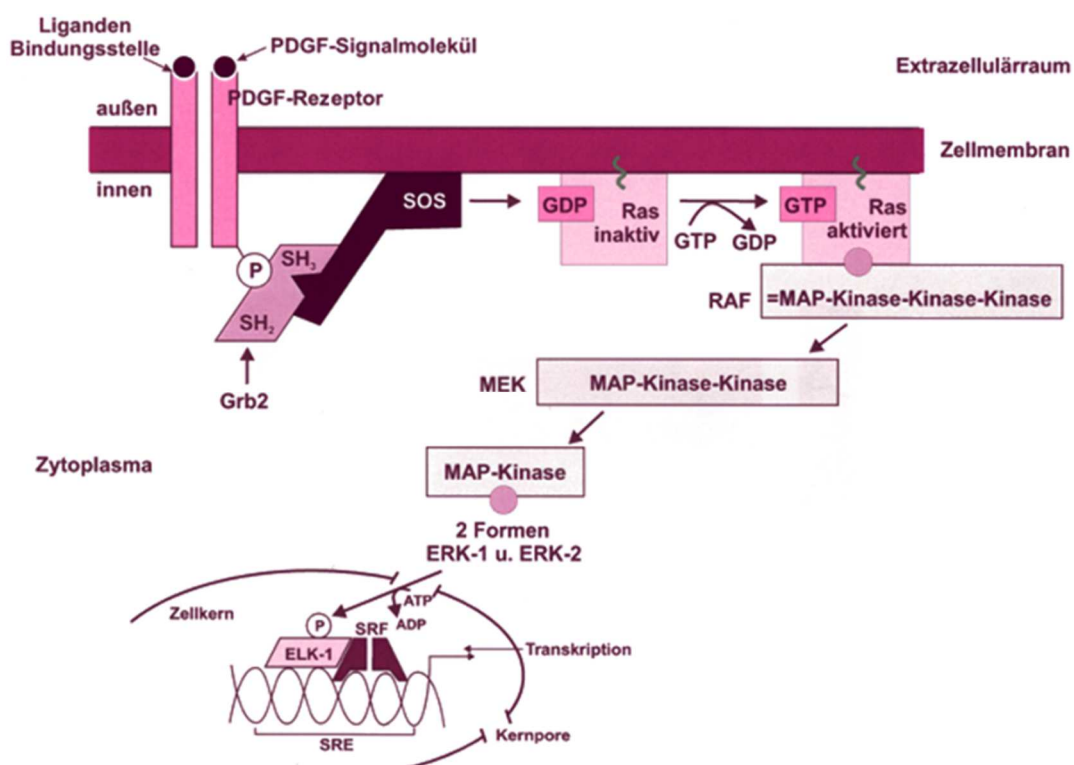


Abb. 25: Schematische Darstellung der ERK1/2-Kaskade: Die Bindung eines Wachstumsfaktors wie EGF oder PDGF an die entsprechende membranständige Rezeptortyrosinkinase einer Zelle führt zur Dimerisierung zweier Rezeptoruntereinheiten und Autophosphorylierung sowie zur Rekrutierung des Grb2/SOS (growth factor receptor-bound protein 2/son of sevenless)-Proteinkomplexes an den Rezeptor. SOS bindet an das membranständige G-Protein Ras (rat sarcoma) und katalysiert den Übergang zu aktiviertem GTP-gebundenem Ras, welches wiederum die MAP-3K Raf-1 (rat fibrosarcoma) aktiviert. Aktiviertes Raf-1 kann durch Phosphorylierung die MAP-2K MEK (MAPK/ERK kinase) aktivieren, die ihrerseits die MAP-Kinase ERK phosphoryliert/aktiviert. Durch Anschaltung von Transkriptionsfaktoren und zellulären Proteinen kann ERK die Genexpression und Proteinaktivität verändern (nach³¹⁹).

6.2 Bedeutung von VTN für die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs nach I/R

6.2.1 Wissenschaftliche Motivation

Die hohe Relevanz des IRS als pathophysiologische Grundlage für sehr häufige Krankheitsbilder mit hoher Letalität, wie Herzinfarkt und ischämischer Schlaganfall, spiegelt den hohen Stellenwert der medizinischen Forschung auf diesem Gebiet wider. Die Reperusionsphase dient in erster Linie der Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung und ist somit unabdingbar für das Überleben des ischämischen Organs/Gewebes. Demnach ist die frühzeitige Eröffnung okkludierter Gefäße das vorrangige Ziel in der Behandlung akuter Gefäßverschlüsse³²⁰. Allerdings hat die Reperfusion auch nachteilige Effekte zur Folge. Die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffradikalen und die damit einhergehende Oxygenierung und Schädigung von Zellbestandteilen sowie die massive Ansammlung von neutrophilen Granulozyten schädigen das Gewebe über die Dauer der Ischämie hinaus. Dieser Umstand wirkt sich negativ auf die Restfunktion des Organs/Gewebes aus und verschlechtert den Langzeitverlauf der Erkrankung nach wie vor. Die Vermeidung bzw. Verringerung des IRS stellt somit eine große Herausforderung dar. Als möglicher Ansatzpunkt wird unter anderem die Inhibition der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten diskutiert, die das Gewebe durch Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, Proteasen und reaktiven Sauerstoffradikalen angreifen^{26, 57, 321, 322, 323}. Auch VTN scheint an der Extravasation dieser Immunzellen beteiligt zu sein^{137, 225}. Neuere Studien lassen zudem vermuten, dass das Glykoprotein in die Pathogenese des IRS involviert ist^{133, 223, 217}. Bereits länger ist bekannt, dass nach akutem Myokard- und Niereninfarkt Ablagerungen von VTN im entsprechenden Gewebe detektiert werden können^{204, 203, 135}. Unlängst wurde bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt darüber hinaus ein deutlich erhöhter Plasma-Spiegel von VTN in der akuten Phase der Erkrankung

festgestellt. Das Ausmaß des VTN-Anstiegs ließ gleichzeitig Rückschlüsse auf einen ungünstigen kardiovaskulären Verlauf ziehen ²²¹. Demnach könnte der Plasma-Spiegel von VTN in Zukunft möglicherweise als eine Art Prognosefaktor bei Patienten mit akutem Kornsyndrom herangezogen werden ^{221, 222}. Welche spezifischen Funktionen VTN im Pathomechanismus des IRS einnimmt, ist noch unklar. In diesem Zusammenhang ist insbesondere weitgehend unbekannt, welche Rolle VTN für die Rekrutierung von Leukozyten nach I/R spielt. Diese bis dato unzureichend in Studien untersuchte Fragestellung war Anlass unserer Forschungsarbeiten.

6.2.2 Endotheliale Deposition von VTN in der Mikrovaskulatur nach I/R

Zu Beginn unserer Experimente untersuchten wir die Auswirkung von I/R auf die endotheliale Deposition von VTN in postkapillären Venolen des Kremastermuskels. Dabei konnten wir erstmals zeigen, dass das Ausmaß der VTN-Deposition auf dem Endothel der Mikrovaskulatur nach I/R signifikant ansteigt. In der Literatur werden mehrere Möglichkeiten genannt, wie VTN an Endothelzellen gebunden werden kann: Zum einen kann das Molekül an endothelial präsentierten uPAR binden ^{135, 148} sowie an GAG, beispielsweise Heparansulfat, welche als Bestandteile der Glykokalix auf der Oberfläche von Endothelzellen vorkommen ^{324, 325, 326, 327, 328}. Zum anderen wird VTN über Integrine – vorwiegend $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine – auf der Oberfläche von Endothelzellen gebunden ^{329, 330, 331, 332, 333}. Mehrere Studien konnten eine Hochregulation des endothelialen $\alpha_v\beta_3$ -Integrins nach ischämischen Ereignissen des Gehirns und des Herzens belegen ^{334, 335, 336, 337, 338}. Im Falle unserer Versuche könnte demnach das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als Hauptakteur für die endotheliale Bindung von VTN fungieren. Die Interaktion mit diesem Integrin, dem sogenannten VTN-Rezeptor, kann neben der RGD-Domäne auch

über die Heparin-bindende Domäne des VTN-Moleküls vermittelt werden^{135, 175}. Über den Konformationszustand bzw. die Multimerisierung des endothelial gebundenen Vitronektins gibt der konfokalmikroskopische Versuchsansatz in unseren Experimenten keinen Aufschluss. In der Literatur wird die Anheftung an das Endothel jedoch häufig nur für multimeres VTN beschrieben^{324, 330, 135, 148}. Da sowohl Integrine und der uPAR, als auch GAG zudem bevorzugt mit multimerem VTN interagieren^{135, 159, 153, 161, 162, 163, 164, 165, 136, 138}, wurde im Falle unserer Versuche vermutlich ebenfalls vornehmlich das funktionell aktivere hochmolekulare VTN visualisiert. Während unter normalen Bedingungen der Anteil an VTN-Multimeren im Plasma sehr gering ist, liegt der Großteil des Plasma-Vitronektins in seiner nativen monomeren Form vor, in der die Heparin-Bindestelle, über die auch GAG und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gebunden werden können, zunächst verborgen ist^{135, 135, 175}. Durch Konformationsänderung bzw. durch die damit häufig einhergehende Multimerisierung werden kryptogene Bindestellen exponiert und somit Interaktionen mit entsprechenden Bindungspartnern begünstigt^{153, 339, 135}. Konformationsänderungen wiederum können induziert werden durch verschiedenste Stimuli wie Aktivierung des Gerinnungssystems, Anlagerung von VTN an Oberflächen und *in vitro* durch denaturierende Agenzien wie Harnstoff^{339, 135, 156}. *In vivo* findet die Multimerisierung von VTN vor allem im Rahmen pathologischer Veränderungen und Gewebeschädigungen statt^{156, 157, 340, 133}. Eine neuere Studie gibt konkrete Hinweise darauf, dass dies auch unter ischämischen Bedingungen der Fall ist¹³³. Demnach könnte in unseren Versuchen eine durch I/R-induzierte Multimerisierung die Anlagerung bzw. Bindung von VTN an das Endothel zusätzlich begünstigen. Des Weiteren können verschiedene Interaktionspartner die Multimerisierung/Konformationsänderung von VTN hervorrufen, wie beispielsweise hochsulfatierte GAG, der Membranangriffskomplex des Komplementsystems (C5b-C7-Komplex), der Thrombin-Antithrombin-Komplex sowie die aktive Form von PAI-1^{153, 155, 341, 339, 155, 153}. Auch nach Dissoziation von PAI-1 bleiben die durch kovalente (Disulfidbrücken) und nicht-kovalente Bindungen stabilisierten VTN-Dimere und -Multimere erhalten¹⁵³. Da die Plasmakonzentration von PAI-1 (0,4 – 20 nM) um ein Vielfaches geringer ist als die von VTN

(2,5 – 5 μM) kann im Plasma vermutlich keine Multimerisierung durch PAI-1 hervorgerufen werden ¹⁵³. Anders verhält es sich in den α -Granula der Thrombozyten, wo VTN bereits in seiner hochmolekularen Form mit Exposition konformationsspezifischer Epitope vorliegt ¹⁵³. Hier scheint durch die vergleichbare Konzentration der zwei genannten Moleküle (26 nM VTN versus 12 nM PAI-1 / 10^9 Thrombozyten) eine Multimerisierung von VTN durch PAI-1 möglich ^{153, 342, 140}. Bekanntermaßen kommt es auch in der Genese des IRS zu einer Akkumulation und Aktivierung von Thrombozyten ^{343, 344, 345, 346, 347}. Demzufolge könnte die beschriebene I/R-induzierte Steigerung der VTN-Bindung an das „aktivierte“ Gefäßendothel des Kremastermuskels, beispielsweise über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine, zusätzlich potenziert werden durch die lokal gesteigerte Entleerung der VTN-enhaltenden α -Granula der Thrombozyten. Ein weiterer Erklärungsansatz der verstärkten endothelialen VTN-Deposition nach I/R könnte darin begründet sein, dass – wie nach akutem Myokardinfarkt ^{221, 222} – der Plasma-Spiegel von VTN ansteigt und das Glykoprotein infolgedessen vermehrt an das Gefäßendothel gebunden wird. Ein derartiger Anstieg des VTN-Plasmaspiegels – möglicherweise infolge einer durch I/R induzierten Akute-Phase-Reaktion mit gesteigerter VTN-Synthese in der Leber ¹³⁵ – erscheint in Hinblick auf die lokale I/R des Kremastermuskels jedoch weniger wahrscheinlich.

6.2.3 Einfluss von VTN auf die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs

In einem nächsten Schritt untersuchten wir den Stellenwert von VTN im Extravasationsprozess von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen/klassischen Monozyten. Anhand des Peritonitisassays konnten wir zeigen, dass VTN für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Ort der Entzündung eine bedeutende Rolle spielt. Die Induktion einer

Peritonitis erfolgte mit Chemokinen, die typischerweise auch für die Pathogenese des IRS eine Rolle spielen ^{348, 285}. Sowohl die CXCL1-induzierte Peritonitis, als potenter Stimulus für neutrophile Granulozyten ³⁴⁹, als auch die CCL2-induzierte Peritonitis, als klassischer Stimulus für Monozyten ³⁵⁰, führte in VTN-defizienten Mäusen zu einer signifikant verminderten Extravasation von neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu WT-Tieren. Diese Versuchsergebnisse lassen in Übereinstimmung mit anderen Studien zunächst eine generelle Bedeutung von VTN für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bei Entzündungsvorgängen vermuten ^{137, 225}. Bemerkenswert war darüber hinaus, dass die Anzahl der rekrutierten neutrophilen Granulozyten in der Gruppe der heterozygoten Knockout-Mäuse vergleichbar niedrig war wie in der Gruppe der homozygoten Knockout-Tiere. Eine ausreichend hohe VTN-Konzentration im Plasma scheint demnach eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Extravasation dieser Immunzellen zu sein. Ob VTN auch eine Rolle im Extravasationsprozess von Monozyten spielt, ist bisher nicht *in vivo* untersucht worden. *In-vitro*-Studien gehen davon aus, dass Monozyten an VTN binden bzw. VTN-abhängig migrieren können ^{351, 352, 159, 351, 353, 354, 355, 356, 147, 177}. Unsere Untersuchungen im Peritonitismodell zeigen, dass VTN *in vivo* keinen Einfluss auf die Migration von inflammatorischen/klassischen Monozyten in die CCL2- bzw. CXCL1-stimulierte Peritonealhöhle hat. Ein Grund für die Abweichung unserer Ergebnisse von der Literatur könnte neben dem *In-vivo*-Versuchsansatz auch die Verwendung anderer inflammatorischer Stimuli sein.

In einer nächsten Versuchsreihe wurde *in vivo* die Bedeutung von VTN für die einzelnen Schritte des Extravasationsprozesses von neutrophilen Granulozyten nach I/R analysiert. Dabei konnten wir erstmals zeigen, dass VTN auch im speziellen Fall des Ischämie-Reperusionsprozesses für die Migration von neutrophilen Granulozyten in das betroffene Gewebe bedeutend ist. Diese Beobachtungen geben konkrete Hinweise darauf, dass das Glykoprotein auch für die Pathogenese des IRS einen relevanten Stellenwert besitzt. In der leukozytären Rekrutierungskaskade beeinflusst VTN im Besonderen die feste Adhärenz und nachfolgende Transmigration von neutrophilen Granulozyten. In diesem Zusammenhang

sind neutrophile Granulozyten in VTN-defizienten Mäusen kaum in der Lage, fest zu adhären, sondern „rutschen“ vielmehr am Endothel entlang und driften nach einer durchschnittlichen Adhärenzzeit von nur etwa 10 Sekunden wieder von der Gefäßwand ab. Das der festen Adhärenz vorausgehende leukozytäre Rollen sowie die Rollgeschwindigkeit sind von VTN hingegen unabhängig. Wie bereits erwähnt, zeigen unsere Untersuchungen, dass VTN auch die der festen Adhärenz nachfolgende Transmigration von neutrophilen Granulozyten beeinflusst. Die Rekrutierung von Leukozyten wird in der Literatur als ein kaskadenartig ablaufender Prozess beschrieben, bei dem ein Schritt gewissermaßen die Voraussetzungen für den nächsten schafft ^{112, 113}. In dieser Hinsicht ist die beobachtete Reduktion der Transmigrationsrate in VTN-defizienten Mäusen vermutlich zumindest teilweise die Konsequenz aus der verringerten Anzahl an fest adhärenen neutrophilen Granulozyten. Allerdings ist es möglich, dass VTN darüber hinaus anderweitig in den Prozess der Transmigration von neutrophilen Granulozyten eingreift: Die parazelluläre Transmigration setzt die Dissoziation von Endothelzellverbindungen, in erster Linie von VE-Cadherin, voraus. Aus mehreren Studien ist bekannt, dass nach Unterbrechung der homophilen Interaktionen von VE-Cadherin durch entsprechende Antikörper die Gefäßpermeabilität sowie die Extravasationsrate von Leukozyten zunimmt ^{133, 357, 358, 359}. Eine neuere Studie zeigt, dass auch multimeres VTN in der Lage ist, über Internalisierung von VE-Cadherin, die vaskuläre Permeabilität nach Ischämie zu erhöhen ¹³³. Dieser Umstand könnte die vermehrte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im extravaskulären ischämischen Gewebe mitbedingen ¹³³.

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der VTN-vermittelten festen Adhärenz von neutrophilen Granulozyten genauer aufzuschlüsseln, führten wir weitere Experimente durch. Zunächst untersuchten wir den Einfluss des Glykoproteins auf die Kolokalisation von adhärenen neutrophilen Granulozyten mit Thrombozyten. Seit jüngerer Zeit ist bekannt, dass Immunzellen sowohl untereinander, als auch mit Thrombozyten interagieren können ^{345, 115, 360, 116, 117}. Thrombozyten können demnach aktiv am Extravasationsprozess von neutrophilen Granulozyten beitragen, indem sie deren Anheftung an das Endothel unterstützen und die

Aktivierung dieser Immunzellen begünstigen^{114, 117, 361, 362}. Außerdem sind Thrombozyten in die Pathogenese des IRS involviert^{363, 361}. Unsere Versuchsergebnisse zeigen jedoch, dass Thrombozyten keinen Einfluss auf die VTN-vermittelte feste Adhärenz von neutrophilen Granulozyten nach I/R haben. Darüber hinaus konnten wir belegen, dass die endotheliale Adhärenz von Thrombozyten unabhängig von VTN ist, obwohl VTN in deren α -Granula gespeichert wird und über $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrine sowie in geringerem Maß vermutlich auch über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine auf der Oberfläche der Blutplättchen gebunden werden kann^{364, 135, 365, 366, 152, 173}.

In weiteren Experimenten untersuchten wir den Einfluss von VTN und Faktoren des fibrinolytischen Systems – uPA und PAI-1 – auf die Aktivität von β_2 -Integrinen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten. Unter Verwendung eines *Binding-Assays* konnte die Affinität dieser Integrine zu ihrem endothelial exprimierten Liganden ICAM-1, einem Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, bestimmt und durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Erstmals zeigen unsere Versuchsergebnisse anhand einer verstärkten Bindung von ICAM-1, dass der Komplex aus multimerem VTN und PAI-1 Affinitätsveränderungen von β_2 -Integrinen hin zur intermediären und offenen hoch-affinen Konformation induzieren kann. Im Gegensatz dazu veränderten multimeres VTN und PAI-1 alleine sowie uPA und der uPA-VTN-Komplex die Affinität von β_2 -Integrinen für ICAM-1 nicht. Derartige Eigenschaften der zuletzt genannten Faktoren bzw. Komplexe wurden auch in der Literatur bisher nicht beschrieben. Untersuchungen von Prof. Dr. Kanse und Mitarbeitern konnten allerdings eine direkte Interaktion des $\alpha_M\beta_2$ -Integrins (Mac-1) mit VTN nachweisen, die für die Migration von neutrophilen Granulozyten vermutlich bedeutend ist¹³⁷. Diese Interaktion war abhängig vom Konformationszustand der beiden Bindungspartner: Einerseits war nur die multimere, nicht jedoch die monomere native Form von VTN in der Lage Mac-1 zu binden. Andererseits hing die Stärke der Bindung vom Konformationszustand des Integrins ab, wobei die offene, hoch-affine Konformation eine stärkere Adhäsion an VTN ermöglichte¹³⁷. Interessanterweise war weder die RGD-Sequenz von VTN, als klassische Andockstelle für Integrine, noch die Soma-

tomedin B (SMB)-Domäne in die Bindung von Mac-1 involviert. Daher beeinflusste die Bindung von PAI-1 an die der RGD-Sequenz direkt anliegende SMB-Bindestelle von VTN auch nicht die Interaktion des Glykoproteins mit Mac-1 ¹³⁷.

Da der Komplex aus VTN und PAI-1 einen starken Einfluss auf die Affinität von β_2 -Integrinen auszuüben scheint, charakterisierten wir als Nächstes die Lokalisation dieser beiden Moleküle auf der Oberfläche von adhärennten neutrophilen Granulozyten in postkapillären Venolen des Kremastermuskels mithilfe der Konfokalmikroskopie. Es ist bekannt, dass VTN an der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten gebunden werden kann ^{225, 137, 367}. Dies wird über diverse Oberflächenmoleküle dieser Immunzellen vermittelt, zu denen die $\alpha_v\beta_3$ -, $\alpha_M\beta_2$ - (Mac-1) und $\alpha_{IIb}\beta_3$ - (GPIIb/IIIa) Integrine sowie der uPAR gehören ^{135, 137, 368, 369, 364, 370, 371, 372, 373}. Des Weiteren konnten wir in vorangegangenen Experimenten bereits eine nach I/R verstärkte Deposition von VTN auf dem Gefäßendothel nachweisen. Unsere Aufnahmen von adhärennten neutrophilen Granulozyten zeigen, dass sich VTN vorwiegend an der Kontaktfläche zwischen dem Endothel und den Immunzellen befindet. Demzufolge könnte das detektierte VTN sowohl endothelialen als auch neutrophilen Ursprungs sein. Die Immunfärbung von PAI-1 überlappte zum Großteil mit der von VTN sodass eine Komplexbildung zwischen den beiden Interaktionspartnern an der endothelialen Kontaktfläche von adhärennten neutrophilen Granulozyten anzunehmen ist. PAI-1 stellt den primären physiologischen Inhibitor der beiden Plasminogenaktivatoren – uPA und tPA – dar und zirkuliert in geringer Konzentration im Blutplasma (5 - 20 ng/ml), wobei der Großteil davon an VTN gebunden vorliegt ¹⁸². PAI-1 kann verschiedene Konformations- und Aktivitätszustände einnehmen. Bekannterweise kann die latente Form von PAI-1 durch Bindung an VTN in den aktiven Zustand überführt werden. Außerdem wird die aktive Form von PAI-1 durch Bindung an VTN stabilisiert, wodurch die äußerst kurze Halbwertszeit des Serin-Protease-Inhibitors verlängert wird ¹⁸². Eine derartige Stabilisierung der aktiven Form von PAI-1 durch VTN könnte auch in unseren Versuchen einen bedeutenden Stellenwert besitzen. Weitere relevante Bindungspartner von PAI-1 sind GAG, die der Anheftung an das Gewebe dienen, sowie *low density lipoprotein receptor*-

related protein-1 (LRP1), einem Mitglied der LDL-Rezeptor-Superfamilie^{181, 374, 180}. LRP1 wird auf der Oberfläche einer Reihe von Zellen exprimiert, unter anderem auf Nervenzellen und Astrozyten im zentralen Nervensystem, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen im Gastrointestinaltrakt, Monozyten/Makrophagen und – wie kürzlich gezeigt werden konnte – auch auf neutrophilen Granulozyten^{375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383}. Bekannterweise kann PAI-1 in allen drei Konformationszuständen (latent, aktiv, inaktiv) an LRP1 binden^{374, 384}, darüber hinaus wird jedoch vermutet, dass die Bindung von PAI-1 an VTN die Interaktion mit LRP1 verhindert^{385, 180, 181}. Neben seiner Hauptaufgabe, der Endozytose von andockenden Liganden, ist LRP1 an Migrations- und Signaltransduktionsprozessen beteiligt^{386, 387, 374}. Immer mehr Studien belegen, dass dem Rezeptor auch im Rahmen der Extravasation von Leukozyten Bedeutung zukommt^{388, 380}. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass LRP1 mit β 2-Integrinen (LFA-1, Mac-1) auf der Oberfläche von Leukozyten interagieren und kolokalisieren kann^{389, 388}. Des Weiteren scheint LRP1 am Clustering – der Redistribution und lokalen Ansammlung – von β 2-Integrinen auf der Oberfläche von migrierenden und aktivierten Leukozyten beteiligt zu sein und somit Bedeutung für die endotheliale Adhärenz der Immunzellen zu haben. Eine verminderte Expression von intaktem LRP1 auf U937-Zellen (einer monozytären Zelllinie) ging in diesem Zusammenhang mit einer verminderten Adhäsionsfähigkeit am Endothel einher³⁸⁸. Eine weitere aktuelle Studie gibt darüber hinaus Hinweise, dass die durch das Zytokin Midkine bzw. *neurite growth-promoting factor 2* (NEGF2) induzierte hoch-affine Konformation von β 2-Integrinen auf neutrophilen Granulozyten ebenfalls LRP1-abhängig ist³⁸⁰. In weiteren *Binding-Assays* untersuchten wir daher die Bedeutung von LRP1 für die VTN-PAI-1-vermittelte Affinitätssteigerung von β 2-Integrinen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten. Das *receptor-associated protein* (RAP), ein LRP-bindendes Protein, das die Interaktion desselben Rezeptors mit sämtlichen Liganden (darunter PAI-1) unterbindet¹⁸², verhinderte die Zunahme der β 2-Integrinaffinität zum Liganden ICAM-1 vollständig. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass RAP neben LRP1 auch andere Mitglieder der Familie der LDL-Rezeptoren hemmt, unter anderem LRP2, LRP5,

LRP6, den *very low density lipoprotein receptor* (VLDLR) und den Apolipoprotein E-Rezeptor-2 (ApoER2) ³⁹⁰. Eine Beteiligung dieser Moleküle am beschriebenen Mechanismus kann somit nicht eindeutig ausgeschlossen werden. Unter den genannten Mitgliedern der LDL-Rezeptoren wird in der Literatur jedoch vorwiegend LRP1 als relevanter Interaktionspartner von PAI-1 beschrieben ^{391, 392, 180, 182, 181}. Daher ist es wahrscheinlich, dass insbesondere LRP1 wesentlich in den Mechanismus der VTN-PAI-1-vermittelten Konformationsänderung von β 2-Integrinen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten involviert ist. Um Moleküle zu identifizieren, die in den intrazellulären Signalweg der Aktivierung von β 2-Integrinen beteiligt sind, untersuchten wir die drei MAP-Kinase-Signalwege, die p38-, JNK- und ERK1/2-Kaskade. Dabei blockierte nur der p38-MAP-Kinase-Inhibitor, nicht jedoch der JNK- und der ERK1/2-Inhibitor, die durch den VTN-PAI-1-Komplex induzierte Aktivierung von neutrophilen β 2-Integrinen vollständig. Neben LRP1 scheint demnach auch die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase für die VTN-PAI-1-induzierte Affinitätssteigerung von β 2-Integrinen auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten bedeutend zu sein. Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen, dass VTN maßgeblich an der Extravasation von neutrophilen Granulozyten, nicht jedoch von Monozyten, beteiligt ist. Nach I/R vermittelt das Glykoprotein vorwiegend die Stabilisierung der Adhärenz am Gefäßendothel und möglicherweise auch die nachfolgende Transmigration dieser Immunzellen in das umliegende Gewebe. Die Aktivierung von leukozytären Integrinen während der Interaktion der Leukozyten mit dem Gefäßendothel spielt für eine erfolgreiche Migration der Immunzellen an den Ort der Entzündung eine wesentliche Rolle. In diesem Zusammenhang konnten wir zeigen, dass PAI-1 im Komplex mit VTN Konformationsänderungen von neutrophilen β 2-Integrinen hin zu erhöhter Affinität zum endothelialen Liganden ICAM-1 induzieren kann. Am letztgenannten Prozess ist ferner der Rezeptor LRP1 beteiligt, der das Signal in das Zellinnere weiterleitet. Der intrazelluläre Signalweg scheint die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase und vermutlich die entsprechende Signalkaskade zu beinhalten (**vgl. Abb. 26**).

Für die Adhärenz von Thrombozyten am Gefäßendothel sowie für Interaktionen der neutrophilen Granulozyten mit den Blutplättchen bei I/R ist VTN hingegen nicht von Relevanz.

6.3 Bedeutung des Chemokins CCL2 für die Rekrutierung von Leukozyten myeloiden Ursprungs

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersuchten wir Mechanismen der CCL2-vermittelten Leukozytenrekrutierung. In diesem Zusammenhang lag unser Hauptaugenmerk auf der Extravasation von neutrophilen Granulozyten, da aus der Literatur bis dato nicht genau hervorgeht, dass CC-Chemokine – sowie CCL2 im Speziellen – auch an der Extravasation der genannten Leukozytensubpopulation beteiligt sind^{393, 394, 395, 396, 278, 274, 279, 397}. Unter Verwendung des Peritonitismodells konnten wir zeigen, dass das CC-Chemokin CCL2 die Extravasation sowohl von inflammatorischen/klassischen Monozyten, als auch von neutrophilen Granulozyten in die entzündete Peritonealhöhle stimulierte. Dies deckt sich mit Erkenntnissen aus der Literatur, wo CCL2 als klassischer Stimulus für inflammatorische/klassische Monozyten charakterisiert wird und neuere Studien darüber hinaus Hinweise auf die CCL2-vermittelte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten geben^{288, 274, 258}. Die Rekrutierung von nicht-klassischen Monozyten war hingegen kaum verändert, was auf die fehlende bzw. äußerst schwache Expression des CCL2-Rezeptors CCR2 auf der Oberfläche dieser Immunzellen zurückzuführen ist^{93, 94, 95, 84, 96, 81}. Im Gegensatz zu inflammatorischen/klassischen Monozyten patrouillieren nicht-klassische Monozyten in der Mikrozirkulation und nehmen auf diese Weise eine Wächterfunktion ein^{100, 81}. Inflammatorische/klassische Monozyten und neutrophile Granulozyten hingegen sind auf ihrer Oberfläche mit dem Chemokinrezeptor CCR2 ausgestattet und können mit endothelial präsentiertem CCL2 interagieren^{398, 84, 258}. Unsere Versuchsergebnisse geben darüber hinaus Hinweise, dass die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 in die CCL2-induzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen/klassischen Monozyten involviert sind, wobei die Extravasation von neutrophilen Granulozyten unter p38-Blockade deutlich, jedoch nicht signifikant vermindert war. Für die Rekrutierung von inflammatorischen/klassischen Monozyten scheint darüber hinaus die JNK-Signalkaskade bedeutend zu sein. In diesem Zusam-

menhang nehmen die MAP-Kinasen möglicherweise verschiedene, aber dennoch sich überlappende Aufgaben im Extravasationsmechanismus einzelner Leukozytensubpopulationen wahr. Die Brücke zwischen der Aktivierung von Chemokinrezeptoren, die der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren angehören, und der Auslösung eines MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges wird vermutlich über die dem Rezeptor nachgeschaltete Aktivierung von Tyrosinkinasen vermittelt ^{399, 400, 401, 402, 403}.

Unsere Daten hinsichtlich der Rekrutierung von inflammatorischen/klassischen Monozyten stehen in weitgehender Übereinstimmung mit der Literatur. In diesem Kontext wiesen auch andere Studien eine durch CCL2-Stimulation von Monozyten induzierte Aktivierung der drei MAP-Kinasen – p38, JNK und ERK1/2 – nach ^{399, 404, 405, 406, 406}. Weitere Studien konnten zeigen, dass MAP-Kinasen ebenfalls für die Extravasation von neutrophilen Granulozyten bedeutend sind. Abhängig vom Stimulus führte die Rekrutierung dieser Leukozytensubpopulation zur Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2, p38 oder beider dieser Signalwege ^{407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 85, 86}. Beispielsweise bewirkte die durch N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und plättchenaktivierender Faktor (PAF) induzierte Stimulation eine p38-abhängige Adhäsion und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, die nach Blockade der genannten MAP-Kinase vermindert, jedoch nicht komplett blockiert war ^{410, 407}. Dies deutet auf die Notwendigkeit eines weiteren p38-unabhängigen Signalweges hin. Ebenfalls konnte eine Aktivierung der ERK1/2-Signalkaskade durch Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit fMLP detektiert werden, wohingegen das Potential von PAF zur Aktivierung dieser Signalkaskade umstritten ist ^{410, 407}. Im Gegensatz zu den MAP-Kinasen p38 und ERK1/2 führte weder die Stimulation mit fMLP noch mit PAF zu einer Aktivierung der neutrophilen MAP-Kinase JNK ^{410, 407}, die auch in unseren Experimenten keinen Einfluss auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die CCL2-stimulierte Peritonealhöhle hatte. Die Partizipation dieser MAP-Kinase am Rekrutierungsprozess von neutrophilen Granulozyten im Allgemeinen wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert ^{415, 410, 411}. Der spezifische Einfluss von MAP-Kinasen auf die CCL2-stimulierte Extravasation von neutrophilen

Granulozyten ist bisher nicht untersucht worden. Mithilfe unserer Versuche konnten wir erste Hinweise liefern, dass die MAP-Kinasen ERK1/2 und p38 auch in dieser Konstellation für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bedeutend sind. Inwieweit die untersuchten MAP-Kinasen die einzelnen Schritte des Rekrutierungsprozesses von inflammatorischen/klassischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten beeinflussen, muss durch weitere Untersuchungen aufgeschlüsselt werden.

In einer nächsten Versuchsreihe untersuchten wir die Bedeutung des Chemokins CCL2 für die Oberflächenexpression von β 1- und β 2-Integrinen sowie für deren Affinität zu den endothelial exprimierten Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie ICAM-1, dem Liganden für die β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1, und VCAM-1, dem Liganden für das β 1-Integrin VLA-4. Unsere Versuchsergebnisse zeigen, dass die Stimulation mit CCL2 das Expressionsniveau der β 1- und β 2-Integrine auf der Oberfläche von Leukozyten myeloiden Ursprungs nicht verändert. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Prof. Hidenori Arai und Mitarbeitern induzierte die CCL2-Stimulation jedoch Konformationsänderungen von monozytären β 1-Integrinen hin zu erhöhter Affinität zu ihren Liganden, während sich die Affinität von β 2-Integrinen nicht veränderte ⁴⁰⁶. Die geringe Oberflächenexpression von VLA-4 auf neutrophilen Granulozyten ²³⁰ erklärt vermutlich die fehlende Aktivierung von β 1-Integrinen auf dieser Leukozytenpopulation. Neutrophile Granulozyten verfügen nämlich vorwiegend über β 2-Integrine, welche auch auf inflammatorischen/klassischen Monozyten zusammen mit β 1-Integrinen zu finden sind ²³⁰. Es ist bekannt, dass die Interaktion von Integrinen in hoch-affiner Konformation mit Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand vermittelt ^{112, 113, 230, 123, 119}. Demzufolge deuten unsere Daten darauf hin, dass die Adhärenz von CCL2-stimulierten Monozyten durch VLA-4 und seinen endothelial präsentierten Liganden VCAM-1 induziert wird.

7 Zusammenfassung

Die Migration von neutrophilen Granulozyten aus der Mikrovaskulatur in das Gewebe gilt als ein Schlüsselereignis in der Genese des Ischämie-Reperfusionsschadens (IRS). Aus diesem Grund wird die Extravasation der genannten Immunzellen als therapeutischer Angriffspunkt zur Verringerung des Gewebes Schadens nach Ischämie-Reperfusion (I/R) diskutiert^{26, 58, 53, 27}. Studien der letzten Jahre geben außerdem Hinweise darauf, dass das Glykoprotein Vitronectin (VTN) in die Pathogenese des IRS involviert ist^{221, 217, 133}. Über welche Mechanismen VTN Einfluss auf diesen Vorgang nimmt ist bislang nur unzureichend geklärt. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher die Bedeutung von VTN für die Leukozytenrekrutierung nach I/R untersucht werden. Anhand konfokalmikroskopischer Aufnahmen konnten wir in einer ersten Versuchsreihe zeigen, dass die endotheliale Deposition von VTN nach I/R signifikant ansteigt. Die Ergebnisse von Versuchen im Peritonitismodell und von intravitalmikroskopischen Untersuchungen belegen weiterhin, dass VTN bei I/R vorwiegend an der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt ist, während die Extravasation von Monozyten unabhängig von VTN ist. Im Speziellen vermittelt das Glykoprotein die Stabilisierung der Adhärenz von neutrophilen Granulozyten am Gefäßendothel sowie die nachfolgende Transmigration. In weiteren *In-vitro*-Untersuchungen konnten wir den zugrundeliegenden Mechanismus dieser Befunde genauer charakterisieren: Im Komplex mit dem Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), einem bedeutenden Interaktionspartner von VTN, induziert das Glykoprotein Konformationsänderungen von neutrophilen β 2-Integrinen hin zu erhöhter Affinität zum endothelial exprimierten Liganden ICAM-1. Dies beruht auf der durch den VTN-PAI-1-Komplex vermittelten Rekrutierung des membranständigen *low density lipoprotein receptor-related protein-1* (LRP1) sowie von p38-mitogenaktivierte Proteinkinase-abhängigen Signalwegen. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse könnte die Entwicklung VTN-inhibierender

Substanzen wesentlich dazu beitragen, die mit der Extravasation von neutrophilen Granulozyten assoziierte Gewebeschädigung nach I/R zu verringern. Klinisch äußerst relevante, mit I/R assoziierte Krankheitsbilder, wie Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall, Sepsis und Organdysfunktion nach Transplantation, könnten auf diese Weise einer pharmakologisch optimierten Therapie zugänglich gemacht werden.

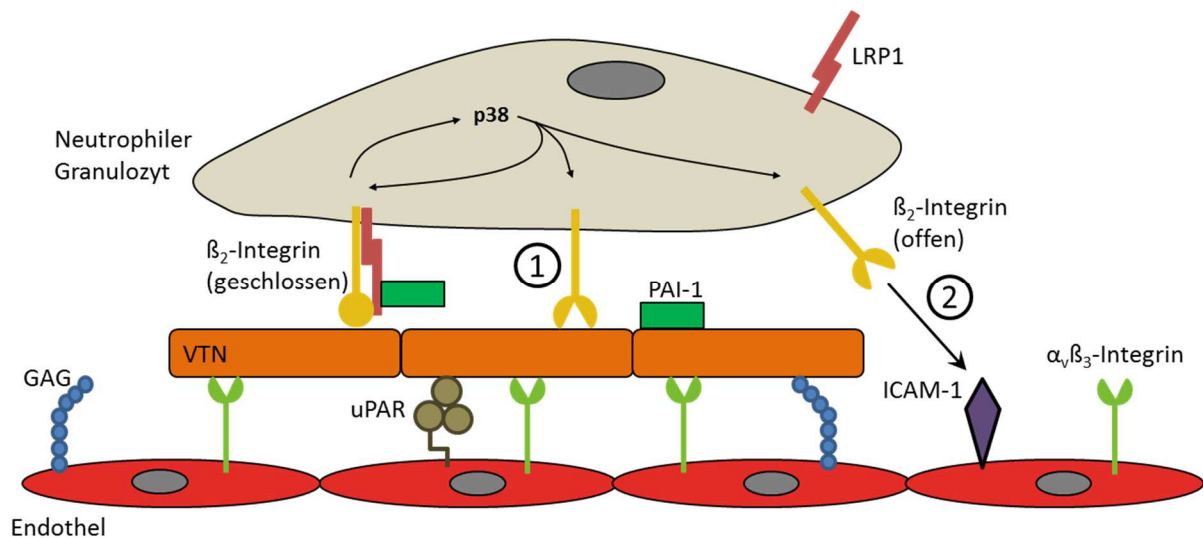


Abb. 26: Möglicher Mechanismus der VTN-vermittelten Stabilisierung der endothelialen Adhärenz von neutrophilen Granulozyten via Konformationsänderung von β_2 -Integrinen: Multimeres VTN kann über $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_v\beta_5$ -Integrine, Glykosaminoglykane (GAG) oder den Urokinase-Rezeptor (uPAR) an das durch I/R „aktivierte“ Gefäßendothel binden. Das β_2 -Integrin Mac-1 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten interagiert sowohl mit VTN als auch mit LRP1. An LRP1 wiederum dockt PAI-1 an, welcher durch vorherige Bindung an VTN in seiner aktiven Form stabilisiert wurde. Über LRP1 und p38-abhängige Signalwege vermittelt VTN zusammen mit PAI-1 die „Aktivierung“ des neutrophilen β_2 -Integrins Mac-1. Die dadurch induzierte höher-affine Bindung von Mac-1 an VTN (1) und/oder endothelialem ICAM-1 (2) ermöglicht eine Stabilisierung der endothelialen Adhäsion von neutrophilen Granulozyten.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten Mechanismen der durch das Chemokin CCL2 vermittelten Leukozytenrekrutierung genauer analysiert werden. In Übereinstimmung mit neueren Studien ^{278, 274, 397} konnten wir anhand von Versuchen im Peritonitismodell zeigen, dass das Chemokin CCL2 neben der Extravasation von inflammatorischen/klassischen Monozyten auch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten *in vivo* initiiert. Durch Identifizierung der dabei involvierten MAP-Kinase-Signalwege charakterisierten wir die zugrundeliegenden Mechanismen der CCL2-vermittelten Extravasation von Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs genauer. Unter Verwendung von *Binding-Assays* konnten wir darüber hinaus zeigen, dass die Stimulation mit dem Chemokin CCL2 Konformationsänderungen von β 1-Integrinen auf der Oberfläche von inflammatorischen/klassischen Monozyten hin zu erhöhter Affinität zu ihren Liganden induziert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CCL2 über die Affinitätssteigerung des monozytären β 1-Integrins VLA-4 die Bindung von inflammatorischen/klassischen Monozyten an endothelial exprimiertes VCAM-1 vermittelt und auf diese Weise die feste Adhärenz dieser Immunzellen am Gefäßendothel unterstützt. Ziel ist es, auf Basis dieser Befunde pharmakologisch in den Mechanismus der CCL2-vermittelten Leukozytenrekrutierung einzugreifen und auf diese Weise die mit dem genannten Chemokin assoziierten Erkrankungen wie Atherosklerose, diabetische Retinopathie, rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose, Asthma bronchiale, Uveitis, HIV sowie diverse Neoplasien präventiv und therapeutisch zu beeinflussen.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Bedeutende Ereignisse in der Pathophysiologie des IRS.	20
Abb. 2: Hämatopoetischer Stammbaum	27
Abb. 3: Kaskade der Leukozytenrekrutierung	28
Abb. 4: Schematische Darstellung des VTN-Moleküls.....	32
Abb. 5: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Einflusses von VTN auf die Rekrutierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen im Peritonitismodell.	49
Abb. 6: Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Einflusses von MAP-Kinasen auf die Rekrutierung der Leukozytensubpopulationen im Peritonitismodell.	50
Abb. 7: Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Bedeutung von VTN für die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung nach I/R.....	60
Abb. 8: Versuchsprotokoll zur Untersuchung der Bedeutung von VTN für die feste Adhärenz von Thrombozyten sowie für die Interaktion/Kolokalisation von adhärenenten neutrophilen Granulozyten mit adhärenenten Thrombozyten nach I/R.....	60
Abb. 9: Konfokalmikroskopische Darstellung der Deposition von VTN und Expression von PECAM-1 in Mikrogefäßen des Kremastermuskels (A). Analyse der Fluoreszenzintensität von VTN in postkapillären Venolen des Kremastermuskels (B).....	72
Abb. 10: Differenzierung der rekrutierten Leukozyten myeloiden Ursprungs mithilfe der Durchflusszytometrie.....	73
Abb. 11: Quantitative Analyse der in die Peritonealhöhle eingewanderten neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen/klassischen Monozyten nach Stimulation mit den Chemokinen CXCL1 bzw. CCL2.....	74
Abb. 12: Analyse des Rollens, der Rollgeschwindigkeit, der kurzen sowie der festen Adhärenz, der mittleren Adhärenzzeit und der Transmigration von Leukozyten myeloiden Ursprungs	76
Abb. 13: <i>In-vivo</i> -Mikroskopie-Aufnahmen mit Visualisierung des intravaskulären „Abrutschens“ eines neutrophilen Granulozyten in einer postkapillären Venole einer VTN-defizienten Maus.....	77
Abb. 14: Analyse der festen Adhärenz (A) sowie der Kolokalisation (B) von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. <i>In-vivo</i> -Mikroskopie-Aufnahmen nach I/R zur Analyse des Interaktionsverhaltens zwischen fest adhärenenten neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten am Gefäßendothel von postkapillären Venolen im Kremastermuskel (C).....	78
Abb. 15: Durchflusszytometrische Analyse des Einflusses von VTN und Faktoren des Fibrinolyse-systems auf die Affinität von neutrophilen β 2-Integrinen zum Liganden ICAM-1	79

Abb. 16: Einfluss des RAP und der MAP-Kinase-Inhibitoren auf die verstärkte Bindung von ICAM-1 via Affinitätssteigerung der neutrophilen β 2-Integrine durch den VTN-PAI-1-Komplex	80
Abb. 17: Konfokalmikroskopische Untersuchung der Expression von VTN und PAI-1 auf der Oberfläche von adhärenenten neutrophilen Granulozyten im WT-Tier	81
Abb. 18: Quantifizierung der in die Peritonealhöhle rekrutierten Leukozyten myeloiden Ursprungs nach Stimulation mit CCL2 sowie Blockade der MAP-Kinasen p38, JNK oder ERK1/2	84
Abb. 19: Durchflusszytometrie-Diagramme, die den Einfluss des Chemokins CCL2 auf die Bindung von monozytären Integrinen an deren Liganden VCAM-1 und ICAM-1 zeigen.....	85
Abb. 20: Schematische Darstellung des Aufbaus der Zelladhäsionsmoleküle Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie.....	88
Abb. 21: Schematische Darstellung der beteiligten Integrine an den einzelnen Schritten des Rekrutierungsprozesses von neutrophilen Granulozyten und Monocyten	91
Abb. 22: Aktivierung von LFA-1 durch „inside-out signaling“ in neutrophilen Granulozyten	92
Abb. 23: Schematische Darstellung des Aufbaus der vier Chemokinfamilien mit Beispielen an entsprechenden Mitgliedern.....	94
Abb. 24: MAP-Kinase-Signalwege	99
Abb. 25: Schematische Darstellung der ERK1/2-Kaskade	100
Abb. 26: Möglicher Mechanismus der VTN-vermittelten Stabilisierung der endothelialen Adhärenz von neutrophilen Granulozyten via Konformationsänderung von β 2-Integrinen	116

9 Tabellenverzeichnis

Tab 1: Systemische Leukozytenzahlen und mikrohämodynamische Parameter.....	82
Tab 2: Expression und Liganden der leukozytären Integrine LFA-1, Mac-1 und VLA-4.....	90
Tab 3: Chemokinfamilien, zugehörige Rezeptoren und Zellaktivierungsmuster.....	96

10 Literaturverzeichnis

1. **Janeway AC, Travers JP, Walport M, Shlomchik MJ.** Immunobiology: The immune system in health and disease, ed 5. New York, Garland Science. 2001.
2. **Murphy K.** Janeway's Immunobiology, ed 8. New York, Garland Scienc. 2011.
3. <http://www.pathologie-online.de/allgemeine-pathologie/5-2/>. Stand Januar 2016.
4. **Rink L, Kruse A, Haase H.** Immunologie für Einsteiger, ed 2. Berlin Heidelberg, Springer. 2015.
5. **Eltzschig HK, Eckle T.** Ischemia and reperfusion - from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011, 17(11):1391-401.
6. **Dorweiler B, Pruefer D, Andrasi TB, Maksan SM, Schmiedt W, Neufang A, Vahl CF.** Ischemia-Reperfusion Injury: Pathophysiology and Clinical Implications. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2007, 33(6):600-12.
7. **Khalil AA, Aziz FA, Hall JC.** Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 2006, 117(3):1024-33.
8. **Jennings RB.** Historical perspective on the pathology of myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 2013, 113(4):428-38.
9. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>. Stand 2014.
10. **Statistisches Bundesamt, Gesundheit.** Todesursachen in Deutschland Stand 2012, Fachserie 12 Reihe 4.
11. **Statistisches Bundesamt, Gesundheit.** Todesursachen in Deutschland Stand 2013, Fachserie 12 Reihe 4.
12. **Statistisches Bundesamt, Gesundheit.** Todesursachen in Deutschland Stand 2014, Fachserie 12 Reihe 4.
13. **Europe, WHO Regional Office for.** Fact sheet: Leading causes of death in Europe. 2012.
14. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Stand Mai 2014.
15. **Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY u.a.** Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet.* 2012, 380: 2095–128.
16. <http://www.worldlifeexpectancy.com/world-rankings-total-deaths>. Stand 2014.
17. **Malek M, Nematbakhsh M.** Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev.* 2015, 4(2):20-7.
18. **Huen SC, Cantley LG.** Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2015, 30(2):199-209.
19. **Chatauret N, Badet L, Barrou B, Hauet T.** Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Prog Urol.* 2014, 24 Suppl 1:S4-12.
20. **Bae EJ, Hwang K, Jang HN, Kim MJ, Jeon DH, Kim HJ, Cho HS, Chang SH, Park DJ.** A retrospective study of short- and long-term effects on renal function after acute renal infarction. *Ren Fail.* 2014, 36(9):1385-9.
21. **Oh YK, Yang CW, Kim YL, Kang SW, Park CW, Kim YS, Lee EY, Han BG, Lee SH, Kim SH, Lee H, Lim CS.** Clinical Characteristics and Outcomes of Renal Infarction. *Am J Kidney Dis.* 2016, 67(2):243-50.
22. **Sakhuja A, Kumar G, Gupta S, Mittal T, Taneja A, Nanchal RS.** Acute Kidney Injury Requiring Dialysis in Severe Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015, 192(8):951-7.
23. **Zarbock A, Gomez H, Kellum JA.** Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care.* 2014, 20(6):588-95.
24. **Bagasha P, Nakwagala F, Kwizera A, Ssekasanvu E, Kalyesubula R.** Acute kidney injury among adult patients with sepsis in a low-income country: clinical patterns and short-term outcomes. *BMC Nephrol.* 2015, 16:4.

25. **Dirkes S.** Sepsis and inflammation: impact on acute kidney injury. *Nephrol Nurs J.* 2013, 40(2):125-32.
26. **Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ.** Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012, 298:229-317.
27. **Widgerow AD.** Ischemia-reperfusion injury: influencing the microcirculatory and cellular environment. *Ann Plast Surg.* 2014, 72(2):253-60.
28. **Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA.** Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011. *Plast Reconstr Surg.* 2011, 128(6):685e-92e.
29. **Eisenhardt SU, Schmidt Y, Karaxha G, Iblher N, Penna V, Torio-Padron N, Stark GB, Bannasch H.** Monitoring molecular changes induced by ischemia/reperfusion in human free muscle flap tissue samples. *Ann Plast Surg.* 2012, 68(2):202-8.
30. **Dragu A, Schnürer S, Surmann-Schmitt C, Unglaub F, Kneser U, Horch RE.** Expression of HIF-1 α in ischemia and reperfusion in human microsurgical free muscle tissue transfer. *Plast Reconstr Surg.* 2011, 127(6):2293-300.
31. **Schmidt Y, Bannasch H, Eisenhardt SU.** Ischemia-reperfusion injury leads to significant tissue damage in free flap surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2012, 129(1):174e-175e.
32. **Molski M, Groth A, Allison AC, Hendrickson M, Siemionow M.** Diannexin treatment decreases ischemia-reperfusion injury at the endothelial cell level of the microvascular bed in muscle flaps. *Ann Plast Surg.* 2009, 63(5):564-71.
33. **Wang Y, Pu L, Li Z, Hu X, Jiang L.** Hypoxia-Inducible Factor-1 α Gene Expression and Apoptosis in Ischemia-Reperfusion Injury: A Rat Model of Early-Stage Pressure Ulcer. *Nurs Res.* 2016, 65(1):35-46.
34. **Mustoe T.** Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *Am J Surg.* 2004, 187(5A):65S-70S.
35. **Loerakker S, Manders E, Strijkers GJ, Nicolay K, Baaijens FP, Bader DL, Oomens CW.** The effects of deformation, ischemia, and reperfusion on the development of muscle damage during prolonged loading. *J Appl Physiol (1985).* 2011, 111(4):1168-77.
36. **Tadros T, Traber DL, Herndon DN.** Trauma- and sepsis-induced hepatic ischemia and reperfusion injury: role of angiotensin II. *Arch Surg.* 2000, 135(7):766-72.
37. **Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT.** Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation.* 2005, 112(17):2660-7.
38. **Gladwin MT.** Adenosine receptor crossroads in sickle cell disease. *Nat Med.* 2011, 17(1):38-40.
39. **Wallace KL, Linden J.** Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. *Blood.* 2010, 116(23):5010-20.
40. **Zhi L, Hu X, Xu J, Yu C, Shao H, Pan X, Hu H, Han C.** The characteristics and correlation between the ischemia-reperfusion and changes of redox status in the early stage of severe burns. *Am J Emerg Med.* 2015, 33(3):338-43.
41. **Zhao L, Luo L, Chen J, Xiao J, Jia W, Xiao Y.** Utilization of extracorporeal membrane oxygenation alleviates intestinal ischemia-reperfusion injury in prolonged hemorrhagic shock animal model. *Cell Biochem Biophys.* 2014, 70(3):1733-40.
42. **Pschyrembel W.** Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, ed 265. Berlin, de Gruyter. 2013.
43. **Kang MY, Zhang Y, Matkovich SJ, Diwan A, Chishti AH, Dorn GW 2nd.** Receptor-independent cardiac protein kinase Calpha activation by calpain-mediated truncation of regulatory domains. *Circ Res.* 2010, 107(7):903-12.
44. **Seal JB, Gewertz BL.** Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury. *Ann Vasc Surg.* 2005, 19(4):572-84.
45. **Murphy AD, McCormack MC, Bichara DA, Nguyen JT, Randolph MA, Watkins MT, Lee RC, Austen WG Jr.** Poloxamer 188 protects against ischemia-reperfusion injury in a murine hind-limb model. *Plast Reconstr Surg.* 2010, 125(6):1651-60.
46. **Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB.** Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1991, 78(6):651-5.
47. **Gottlieb RA.** Cell Death Pathways in Acute I/R Injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2011, 16(3-4): 233-238.
48. **Halestrap AP.** Mitochondria and reperfusion injury of the heart—a holey death but not beyond salvation. *J Bioenerg Biomembr.* 2009, 41(2):113-21.

49. **Halestrap AP, Pasdois P.** The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009, 1787(11):1402-15.
50. **Wood KC, Gladwin MT.** The hydrogen highway to reperfusion therapy. *Nat Med*. 2007, 13(6):673-4.
51. **Chait LA, May JW Jr, O'Brien BM, Hurley JV.** The effects of the perfusion of various solutions on the no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1978, 61(3):421-30.
52. **Gute DC, Ishida T, Yaremizu K, Korthuis RJ.** Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem*. 1998, 179(1-2):169-87.
53. **Carden DL, Granger DN.** Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000, 190(3):255-66.
54. **Menger MD, Rücker M, Vollmar B.** Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock*. 1997, 8(1):2-7.
55. **Zhang M, Austen WG Jr, Chiu I, Alicot EM, Hung R, Ma M, Verna N, Xu M, Hechtman HB, Moore FD Jr, Carroll MC.** Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101(11):3886-91.
56. **Kulik L, Fleming SD, Moratz C, Reuter JW, Novikov A, Chen K, Andrews KA, Markaryan A, Quigg RJ, Silverman GJ, Tsokos GC, Holers VM.** Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to develop intestinal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol*. 2009, 182(9):5363-73.
57. **Rodrigues SF, Granger DN.** Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Res*. 2010, 87(2):291-9.
58. **Ioannou A, Dalle Lucca J, Tsokos GC.** Immunopathogenesis of ischemia/reperfusion-associated tissue damage. *Clin Immunol*. 2011, 141(1):3-14.
59. **Friedewald JJ, Rabb H.** Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int*. 2004, 66(2):486-91.
60. **Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ.** The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007, 204(12):3037-47.
61. **Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ.** Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009, 325(5940):612-6.
62. **Parkin J, Cohen B.** An overview of the immune system. *Lancet*. 2001, 357(9270):1777-89.
63. **Johnson PW, Stankova J, Dexter D, Roder JC.** The in vivo clearance of Ha-ras transformants by natural killer cells. *Clin Exp Metastasis*. 1990, 8(1):13-25.
64. **McArdle SE, Rees RC, Mulcahy KA, Saba J, McIntyre CA, Murray AK.** Induction of human cytotoxic T lymphocytes that preferentially recognise tumour cells bearing a conformational p53 mutant. *Cancer Immunol Immunother*. 2000, 49(8):417-25.
65. **Løvik G, Rolstad B.** Natural killer cells - important in the immunologic defense. *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2000, 120(13):1542-6.
66. **Groettrup M, Schmidtke G.** Intracellular processing of viral and tumor antigens by proteasomes. *Schweiz Med Wochenschr*. 1999, 129(44):1660-5.
67. **Kaufmann SH.** Basiswissen Immunologie. Berlin Heidelberg, Springer. 2014.
68. **Delves PJ, Roitt IM.** The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000, 343(1):37-49.
69. **Wang J, Arase H.** Regulation of immune responses by neutrophils. *Ann N Y Acad Sci*. 2014, 1319:66-81.
70. **Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, Benarafa C, Roos D, Skokowa J, Hartl D.** Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*. 2015, 11(3):e1004651.
71. **Linden JR, Kunkel D, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM.** The role of galectin-3 in phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* by human neutrophils. *Cell Microbiol*. 2013, 15(7):1127-42.
72. **Ganten D, Ruckpaul K.** Immunsystem und Infektiologie. Berlin Heidelberg, Springer. 1999.
73. **Simard JC, Noël C, Tessier PA, Girard D.** Human S100A9 potentiates IL-8 production in response to GM-CSF or fMLP via activation of a different set of transcription factors in neutrophils. *FEBS Lett*. 2014, 588(13):2141-6.

74. **Cao J, Gong Y, Yin Y, Wang L, Ying B, Chen T, Zhang X.** Pneumococcal proteins PspA and PspC induce CXCL8 production in human neutrophils: implications in pneumococcal infections. *Microbes Infect.* 2010, 12(12-13):1051-60.
75. **Gute D, Korthuis RJ.** Role of leukocyte adherence in reperfusion-induced micro-vascular dysfunction and tissue injury. In: Granger DN, Schmid-Schönbein GW: Physiology and Pathophysiology of Leukocyte Adhesion. New York Oxford, Oxford University Press. 1995.
76. **Kelly KJ, Williams WW Jr, Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV.** Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest.* 1996, 97(4):1056-63.
77. **Rabb H, Mendiola CC, Dietz J, Saba SR, Issekutz TB, Abanilla F, Bonventre JV, Ramirez G.** Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats. *Am J Physiol.* 1994, 267(6 Pt 2):F1052-8.
78. **Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN.** Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1988, 254(5 Pt 2):H823-7.
79. **Teoh NC, Ito Y, Field J, Bethea NW, Amr D, McCuskey MK, McCuskey RS, Farrell GC, Allison AC.** Diannexin, a novel annexin V homodimer, provides prolonged protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Gastroenterology.* 2007, 133(2):632-46.
80. **Shen XD, Ke B, Zhai Y, Tsuchihashi SI, Gao F, Duarte S, Coito A, Busuttil RW, Allison AC, Kupiec-Weglinski JW.** Diannexin, a novel annexin V homodimer, protects rat liver transplants against cold ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant.* 2007, 7(11):2463-71.
81. **Shi C, Pamer EG.** Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011, 11(11): 762–774.
82. **Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG.** Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008, 26:421-52.
83. **Ueda Y, Kondo M, Kelsoe G.** Inflammation and the reciprocal production of granulocytes and lymphocytes in bone marrow. *J Exp Med.* 2005, 201(11):1771-80.
84. **Geissmann F, Jung S, Littman DR.** Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003, 19(1):71-82.
85. **Sunderkötter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ.** Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol.* 2004, 172(7):4410-7.
86. **Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F.** Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009, 27:669-92.
87. **Sprent J.** Antigen-presenting cells. Professionals and amateurs. *Curr Biol.* 1995, 5(10):1095-7.
88. **Reimann J, Kaufmann SH.** Alternative antigen processing pathways in anti-infective immunity. *Curr Opin Immunol.* 1997, 9(4):462-9.
89. **Fearon DT, Locksley RM.** The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 1996, 272(5258):50-3.
90. **Zigmond E, Varol C, Farache J, Elmaliyah E, Satpathy AT, Friedlander G, Mack M, Shpigel N, Boneca IG, Murphy KM, Shakhar G, Halpern Z, Jung S.** Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity.* 2012, 37(6):1076-90.
91. **Tung YC, Ou TT, Tsai WC.** Defective Mycobacterium tuberculosis antigen presentation by monocytes from tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013, 17(9):1229-34.
92. **Clark HL, Banks R, Jones L, Hornick TR, Higgins PA, Burant CJ, Canaday DH.** Characterization of MHC-II antigen presentation by B cells and monocytes from older individuals. *Clin Immunol.* 2012, 144(2):172-7.
93. **Francke A, Herold J, Weinert S, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC.** Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *J Histochem Cytochem.* 2011, 59(9):813-25.
94. **Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H.** Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014, 2(1):1.
95. **Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ.** Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009, 29(10):1412-8.

96. <https://www.rndsystems.com/research-area/monocyte-markers>. Stand Januar 2016.
97. **Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B.** Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*. 2007, 204(5):1057-69.
98. **Dunay IR, Damatta RA, Fux B, Presti R, Greco S, Colonna M, Sibley LD.** Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2008, 29(2):306-17.
99. **Serbina NV, Pamer EG.** Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006, 7(3):311-7.
100. **Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, Sarnacki S, Cumano A, Lauvau G, Geissmann F.** Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*. 2007, 317(5838):666-70.
101. **Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK.** Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010, 121(22):2437-45.
102. **Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG.** CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*. 2005, 96(8):881-9.
103. **Kimura S, Ozaki KS, Ueki S, Zhang M, Yokota S, Stolz DB, Geller DA, Murase N.** Contribution of alloantigens to hepatic ischemia/reperfusion injury: Roles of natural killer cells and innate immune recognition of nonself. *Liver Transpl*. 2016, 22(1):80-90.
104. **Zhang ZX, Shek K, Wang S, Huang X, Lau A, Yin Z, Sun H, Liu W, Garcia B, Rittling S, Jevnikar AM.** Osteopontin expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney ischemia reperfusion injury. *J Immunol*. 2010, 185(2):967-73.
105. **Neumann J.** Immunbiologie: Eine Einführung. Berlin Heidelberg, Springer. 2008.
106. **Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M.** Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*. 2008, 73(11):975-83.
107. **Peterson RA.** Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol*. 2012, 40(2):186-204.
108. **Jiang H, Chess L.** Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med*. 2006, 354(11):1166-76.
109. **Goodman T, Lefrançois L.** Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature*. 1988, 333(6176):855-8.
110. **Khandoga A, Hanschen M, Kessler JS, Krombach F.** CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology*. 2006, 43(2):306-15.
111. <https://de.wikipedia.org/wiki/Hämatopoese>. Stand Dezember 2015.
112. **Vestweber D.** How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*. 2015, 15(11):692-704.
113. **Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S.** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology*. 2007, 7(9): 678-689.
114. **Semple JW, Italiano JE Jr, Freedman J.** Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol*. 2011, 11(4):264-74.
115. **Sreeramkumar V, Adrover JM, Ballesteros I, Cuartero MI, Rossaint J, Bilbao I, Nacher M, Pitaval C, Radovanovic I, Fukui Y, McEver RP, Filippi MD, Lizasoain I, Ruiz-Cabello J, Zarbock A, Moro MA, Hidalgo A.** Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*. 2014, 346(6214):1234-8.
116. **Swirski FK, Robbins CS.** Neutrophils usher monocytes into sites of inflammation. *Circ Res*. 2013, 112(5):744-5.
117. **Zuchtriegel G, Uhl B, Puhr-Westerheide D, Pörnbacher M, Lauber K, Krombach F, Reichel CA.** Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol*. 2016, 14(5):e1002459.
118. **Kreuger J, Phillipson M.** Targeting vascular and leukocyte communication in angiogenesis, inflammation and fibrosis. *Nat Rev Drug Discov*. 2016 Feb, 15(2):125-42.
119. **Lefort CT, Ley K.** Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol*. 2012, 3:157.

120. **Voisin MB, Nourshargh S.** Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun.* 2013, 5(4):336-47.
121. **McEver RP.** Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res.* 2015, 107(3):331-9.
122. **Vestweber D, Blanks JE.** Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 1999, 79(1):181-213.
123. **Hyun YM, Lefort CT, Kim M.** Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Immunol Res.* 2009, 45(2-3):195-208.
124. **Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M.** Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010, 11(5):366-78.
125. **Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, Dvorak HF, Dvorak AM, Springer TA.** Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity.* 2007, 26(6):784-97.
126. **Carman CV, Springer TA.** Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr Opin Cell Biol.* 2008, 20(5):533-40.
127. **Nourshargh S, Alon R.** Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity.* 2014, 41(5):694-707.
128. **Nourshargh S, Krombach F, Dejana E.** The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol.* 2006, 80(4):714-8.
129. **Muller WA.** The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol.* 1995, 57(4):523-8.
130. **Wegmann F, Petri B, Khandoga AG, Moser C, Khandoga A, Volkery S, Li H, Nasdala I, Brandau O, Fässler R, Butz S, Krombach F, Vestweber D.** ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J Exp Med.* 2006, 203(7):1671-7.
131. **Cera MR, Fabbri M, Molendini C, Corada M, Orsenigo F, Rehberg M, Reichel CA, Krombach F, Pardi R, Dejana E.** JAM-A promotes neutrophil chemotaxis by controlling integrin internalization and recycling. *J Cell Sci.* 2009, 122(Pt 2):268-77.
132. **Proebstl D, Voisin MB, Woodfin A, Whiteford J, D'Acquisto F, Jones GE, Rowe D, Nourshargh S.** Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. *J Exp Med.* 2012, 209(6):1219-34.
133. **Li R, Ren M, Chen N, Luo M, Zhang Z, Wu J.** Vitronectin increases vascular permeability by promoting VE-cadherin internalization at cell junctions. *PLoS One.* 2012, 7(5):e37195.
134. **Preissner KT.** Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Biol.* 1991, 7:275-310.
135. **Preissner KT, Reuning U.** Vitronectin in vascular context: facets of a multitasking matricellular protein. *Semin Thromb Hemost.* 2011, 37(4):408-24.
136. **Schwartz I, Seger D, Shaltiel S.** Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999, 31(5):539-44.
137. **Kanse SM, Matz RL, Preissner KT, Peter K.** Promotion of leukocyte adhesion by a novel interaction between vitronectin and the beta2 integrin Mac-1 (alphaMbeta2, CD11b/CD18). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24(12):2251-6.
138. **Seiffert D.** Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histol Histopathol.* 1997, 12(3):787-97.
139. **Røger M, Halstensen TS, Høgåsen K, Mollnes TE, Solum NO, Hovig T.** Platelets and vitronectin: immunocytochemical localization and platelet interaction with exogenously added vitronectin. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1992, 34(1):47-54.
140. **Preissner KT, Holzhüter S, Justus C, Müller-Berghaus G.** Identification of and partial characterization of platelet vitronectin: evidence for complex formation with platelet-derived plasminogen activator inhibitor-1. *Blood.* 1989, 74(6):1989-96.
141. **Hill SA, Shaughnessy SG, Joshua P, Ribau J, Austin RC, Podor TJ.** Differential mechanisms targeting type 1 plasminogen activator inhibitor and vitronectin into the storage granules of a human megakaryocytic cell line. *Blood.* 1996, 87(12):5061-73.
142. **Seiffert D, Schleef RR.** Two functionally distinct pools of vitronectin (Vn) in the blood circulation: identification of a heparin-binding competent population of Vn within platelet alpha-granules. *Blood.* 1996, 88(2):552-60.
143. **Seiffert D, Loskutov DJ.** Evidence that type 1 plasminogen activator inhibitor binds to the

somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem.* 1991, 266(5):2824-30.

144. **Wei Y, Waltz DA, Rao N, Drummond RJ, Rosenberg S, Chapman HA.** Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem.* 1994, 269(51):32380-8.

145. **Schroeck F, Arroyo de Prada N, Sperl S, Schmitt M, Viktor M.** Interaction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) with vitronectin (Vn): mapping the binding sites on PAI-1 and Vn. *Biol Chem.* 383(7-8):1143-9.

146. **Okumura Y, Kamikubo Y, Curriden SA, Wang J, Kiwada T, Futaki S, Kitagawa K, Loskutoff DJ.** Kinetic analysis of the interaction between vitronectin and the urokinase receptor. *J Biol Chem.* 2002, 277(11):9395-404.

147. **Deng G, Curriden SA, Wang S, Rosenberg S, Loskutoff DJ.** Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release? *J Cell Biol.* 1996, 134(6):1563-71.

148. **Kanse SM, Kost C, Wilhelm OG, Andreassen PA, Preissner KT.** The urokinase receptor is a major vitronectin-binding protein on endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1996, 224(2):344-53.

149. **Kost C, Stüber W, Ehrlich HJ, Pannekoek H, Preissner KT.** Mapping of binding sites for heparin, plasminogen activator inhibitor-1, and plasminogen to vitronectin's heparin-binding region reveals a novel vitronectin-dependent feedback mechanism for the control of plasmin formation. *J Biol Chem.* 1992, 267(17):12098-105.

150. **Gechtman Z, Belleli A, Lechpammer S, Shaltiel S.** The cluster of basic amino acids in vitronectin contributes to its binding of plasminogen activator inhibitor-1: evidence from thrombin-, elastase- and plasmin-cleaved vitronectins and anti-peptide antibodies. *Biochem J.* 1997, 325 (Pt 2):339-49.

151. **Parker CJ, Stone OL, White VF, Bernshaw NJ.** Vitronectin (S protein) is associated with platelets. *Br J Haematol.* 1989, 71(2):245-52.

152. **Asch E, Podack E.** Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1990, 85(5):1372-8.

153. **Seiffert D, Loskutoff DJ.** Type 1 plasminogen activator inhibitor induces multimerization of plasma vitronectin. A suggested mechanism for the generation

of the tissue form of vitronectin in vivo. *J Biol Chem.* 1996, 271(47):29644-51.

154. **Seiffert D.** The glycosaminoglycan binding site governs ligand binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem.* 1997, 272(15):9971-8.

155. **Tomasini BR, Mosher DF.** Conformational states of vitronectin: preferential expression of an antigenic epitope when vitronectin is covalently and noncovalently complexed with thrombin-antithrombin III or treated with urea. *Blood.* 1988, 72(3):903-12.

156. **Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GA.** Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am J Pathol.* 2000, 156(5):1489-98.

157. **Davis GE.** Matricryptic sites control tissue injury responses in the cardiovascular system: relationships to pattern recognition receptor regulated events. *J Mol Cell Cardiol.* 2010, 48(3):454-60.

158. **Naski MC, Lawrence DA, Mosher DF, Podor TJ, Ginsburg D.** Kinetics of inactivation of alpha-thrombin by plasminogen activator inhibitor-1. Comparison of the effects of native and urea-treated forms of vitronectin. *J Biol Chem.* 1993, 268(17):12367-72.

159. **Waltz DA, Chapman HA.** Reversible cellular adhesion to vitronectin linked to urokinase receptor occupancy. *J Biol Chem.* 1994, 269(20):14746-50.

160. **Gebb C, Hayman EG, Engvall E, Ruoslahti E.** Interaction of vitronectin with collagen. *J Biol Chem.* 1986, 261(35):16698-703.

161. **Barnes DW, Reing JE, Amos B.** Heparin-binding properties of human serum spreading factor. *J Biol Chem.* 1985, 260(16):9117-22.

162. **Hayashi M, Akama T, Kono I, Kashiwagi H.** Activation of vitronectin (serum spreading factor) binding of heparin by denaturing agents. *J Biochem.* 1985, 98(4):1135-8.

163. **Akama T, Yamada KM, Seno N, Matsumoto I, Kono I, Kashiwagi H, Funaki T, Hayashi M.** Immunological characterization of human vitronectin and its binding to glycosaminoglycans. *J Biochem.* 1986, 100(5):1343-51.

164. **Izumi M, Yamada KM, Hayashi M.** Vitronectin exists in two structurally and functionally distinct forms in human plasma. *Biochim Biophys Acta.* 1989, 990(2):101-8.

165. **Izumi M, Shimo-Oka T, Morishita N, Ii I, Hayashi M.** Identification of the collagen-binding domain of vitronectin using monoclonal antibodies. *Cell Struct Funct.* 1988, 13(3):217-25.
166. **Vitronectin, Gen.**
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7448>. Stand Januar 2016.
167. **Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA.** Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 1994, 264(5158):569-71.
168. **Drake CJ, Cheresh DA, Little CD.** An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *J Cell Sci.* 1995, 108 (Pt 7):2655-61.
169. **Smith JW, Vestal DJ, Irwin SV, Burke TA, Cheresh DA.** Purification and functional characterization of integrin alpha v beta 5. An adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem.* 1990, 265(19):11008-13.
170. **Huang X, Wu J, Spong S, Sheppard D.** The integrin $\alpha v \beta 6$ is critical for keratinocyte migration on both its known ligand, fibronectin, and on vitronectin. *J Cell Sci.* 1998, 111 (Pt 15):2189-95.
171. **Nishimura SL, Sheppard D, Pytela R.** Integrin alpha v beta 8. Interaction with vitronectin and functional divergence of the beta 8 cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 1994, 269(46):28708-15.
172. **Thiagarajan P, Kelly K.** Interaction of thrombin-stimulated platelets with vitronectin (S-protein of complement) substrate: inhibition by a monoclonal antibody to glycoprotein IIb-IIIa complex. *Thromb Haemost.* 1988, 60(3):514-7.
173. **Thiagarajan P, Kelly KL.** Exposure of binding sites for vitronectin on platelets following stimulation. *J Biol Chem.* 1988, 263(6):3035-8.
174. **Schnapp LM, Hatch N, Ramos DM, Klimanskaya IV, Sheppard D, Pytela R.** The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *J Biol Chem.* 1995, 270(39):23196-202.
175. **Maile LA, Aday AW, Busby WH, Sanghani R, Veluvolu U, Clemmons DR.** Modulation of integrin antagonist signaling by ligand binding of the heparin-binding domain of vitronectin to the alphaVbeta3 integrin. *J Cell Biochem.* 2008, 105(2):437-46.
176. **Ferraris GM1, Schulte C2, Buttiglione V, De Lorenzi V, Piontini A, Galluzzi M, Podestà A, Madsen CD, Sidenius N.** The interaction between uPAR and vitronectin triggers ligand-independent adhesion signalling by integrins. *EMBO J.* 2014, 33(21):2458-72.
177. **Waltz DA, Natkin LR, Fujita RM, Wei Y, Chapman HA.** Plasmin and plasminogen activator inhibitor type 1 promote cellular motility by regulating the interaction between the urokinase receptor and vitronectin. *J Clin Invest.* 1997, 100(1):58-67.
178. **Madsen CD, Ferraris GM, Andolfo A, Cunningham O, Sidenius N.** uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J Cell Biol.* 2007, 177(5):927-39.
179. **Petzinger J, Saltel F, Hersemeyer K, Daniel JM, Preissner KT, Wehrle-Haller B, Kanse SM.** Urokinase receptor (CD87) clustering in detergent-insoluble adhesion patches leads to cell adhesion independently of integrin. *Cell Commun Adhes.* 2007, 14(4):137-55.
180. **Czekay RP, Wilkins-Port CE, Higgins SP, Freytag J, Overstreet JM, Klein RM, Higgins CE, Samarakoon R, Higgins PJ.** PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *Int J Cell Biol.* 2011, 2011:562481.
181. **Wilkins-Port CE, Freytag J, Higgins SP, Higgins PJ.** PAI-1: A Multifunctional SERPIN with Complex Roles in Cell Signaling and Migration. *Cell Communication Insights.* 2010, 3:1-10.
182. **Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, Mihaly J, Prager GW.** Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci.* 2002, 17:56-61.
183. **Lee CC, Huang TS.** Plasminogen Activator Inhibitor-1: The expression, biological Functions, and Effects on Tumorigenesis . *Journal of Cancer Molecules.* 2005, 1(1): 25-36.
184. **Barnes DW, Silnutzer J, See C, Shaffer M.** Characterization of human serum spreading factor with monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983, 80(5):1362-6.
185. **Shaffer MC, Foley TP, Barnes DW.** Quantitation of spreading factor in human biologic fluids. *J Lab Clin Med.* 1984, 103(5):783-791.
186. **Preissner KT, Wassmuth R, Müller-Berghaus G.** Physicochemical characterization of human S-protein and its function in the blood coagulation system. *Biochem J.* 1985, 231(2):349-55.

187. **Conlan MG, Tomasini BR, Schultz RL, Mosher DF.** Plasma vitronectin polymorphism in normal subjects and patients with disseminated intravascular coagulation. *Blood*. 1988, 72(1):185-90.
188. **Kemkes-Matthes B, Preissner KT, Langenscheidt F, Matthes KJ, Müller-Berghaus G.** S protein/vitronectin in chronic liver diseases: correlations with serum cholinesterase, coagulation factor X and complement component C3. *Eur J Haematol*. 1987, 39(2):161-5.
189. **Kobayashi J, Yamada S, Kawasaki H.** Distribution of vitronectin in plasma and liver tissue: relationship to chronic liver disease. *Hepatology*. 1994, 20(6):1412-7.
190. **Seiffert D, Crain K, Wagner NV, Loskutoff DJ.** Vitronectin gene expression in vivo. Evidence for extrahepatic synthesis and acute phase regulation. *J Biol Chem*. 1994, 269(31):19836-42.
191. **Seiffert D, Geisterfer M, Gauldie J, Young E, Podor TJ.** IL-6 stimulates vitronectin gene expression in vivo. *J Immunol*. 1995, 155(6):3180-5.
192. **Pohl WR, Conlan MG, Thompson AB, Ertl RF, Romberger DJ, Mosher DF, Rennard SI.** Vitronectin in bronchoalveolar lavage fluid is increased in patients with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis*. 1991, 143(6):1369-75.
193. **Eklund AG, Sigurdardottir O, Ohrn M.** Vitronectin and its relationship to other extracellular matrix components in bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis*. 1992, 145(3):646-50.
194. **Teschler H, Pohl WR, Thompson AB, Konietzko N, Mosher DF, Costabel U, Rennard SI.** Elevated levels of bronchoalveolar lavage vitronectin in hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Respir Dis*. 1993, 147(2):332-7.
195. **Preissner KT, Seiffert D.** Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. *Thromb Res*. 1998, 89(1):1-21.
196. **Hintner H, Dahlbäck K, Dahlbäck B, Pepys MB, Breathnach SM.** Tissue vitronectin in normal adult human dermis is non-covalently bound to elastic tissue. *J Invest Dermatol*. 1991, 96(5):747-53.
197. **Hintner H, Stanzl U, Dahlbäck K, Dahlbäck B, Breathnach SM.** Vitronectin shows complement-independent binding to isolated keratin filament aggregates. *J Invest Dermatol*. 1989, 93(5):656-61.
198. **Dahlbäck K, Löfberg H, Alumets J, Dahlbäck B.** Immunohistochemical demonstration of age-related deposition of vitronectin (S-protein of complement) and terminal complement complex on dermal elastic fibers. *J Invest Dermatol*. 1989, 92(5):727-33.
199. **Grzesik WJ, Robey PG.** Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res*. 1994, 9(4):487-96.
200. **Anderson DH, Hageman GS, Mullins RF, Neitz M, Neitz J, Ozaki S, Preissner KT, Johnson LV.** Vitronectin gene expression in the adult human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999, 40(13):3305-15.
201. **Niculescu F, Rus HG, Poruțiu D, Ghiurca V, Vlaicu R.** Immunoelectron-microscopic localization of S-protein/vitronectin in human atherosclerotic wall. *Atherosclerosis*. 1989, 78(2-3):197-203.
202. **Guettier C, Hinglais N, Bruneval P, Kazatchkine M, Bariety J, Camilleri JP.** Immunohistochemical localization of S protein/vitronectin in human atherosclerotic versus arteriosclerotic arteries. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1989, 414(4):309-13.
203. **Väkevä A, Laurila P, Meri S.** Regulation of complement membrane attack complex formation in myocardial infarction. *Am J Pathol*. 1993, 143(1):65-75.
204. **Väkevä A, Meri S, Lehto T, Laurila P.** Activation of the terminal complement cascade in renal infarction. *Kidney Int*. 1995, 47(3):918-26.
205. **Falk RJ, Podack E, Dalmaso AP, Jennette JC.** Localization of S protein and its relationship to the membrane attack complex of complement in renal tissue. *Am J Pathol*. 1987, 127(1):182-90.
206. **Dufourcq P, Louis H, Moreau C, Daret D, Boisseau MR, Lamazière JM, Bonnet J.** Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998, 18(2):168-76.
207. **van Aken BE, Seiffert D, Thinnes T, Loskutoff DJ.** Localization of vitronectin in the normal and atherosclerotic human vessel wall. *Histochem Cell Biol*. 1997, 107(4):313-20.
208. **Garred P, Lyon H, Christoffersen P, Mollnes TE, Tranum-Jensen J.** Deposition of C3, the terminal complement complex and vitronectin in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *Liver*. 1993, 13(6):305-10.

209. **Koukoulis GK, Shen J, Virtanen I, Gould VE.** Vitronectin in the cirrhotic liver: an immunomarker of mature fibrosis. *Hum Pathol.* 2001, 32(12):1356-62.
210. **Zanusso GL, Moretto G, Bonetti B, Monaco S, Rizzuto N.** Complement neoantigen and vitronectin are components of plaques in amyloid AL neuropathy. *Ital J Neurol Sci.* 1992, 13(6):493-9.
211. **Zhan S.-S, Veerhuis R, Janssen I, Kamphorst W, Eikelenboom P.** Immunohistochemical distribution of the inhibbtors of the inhibitors of the terminal complement complex in Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 1994, 3:111-7.
212. **Eikelenboom P, Zhan SS, Kamphorst W, van der Valk P, Rozemuller JM.** Cellular and substrate adhesion molecules (integrins) and their ligands in cerebral amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Virchows Arch.* 1994, 424(4):421-7.
213. **Shin TM, Isas JM, Hsieh CL, Kaye R, Glabe CG, Langen R, Chen J.** Formation of soluble amyloid oligomers and amyloid fibrils by the multifunctional protein vitronectin. *Mol Neurodegener.* 2008, 3:16.
214. **Hageman GS, Mullins RF, Russell SR, Johnson LV, Anderson DH.** Vitronectin is a constituent of ocular drusen and the vitronectin gene is expressed in human retinal pigmented epithelial cells. *FASEB J.* 1999, 13(3):477-84.
215. **Ozaki S, Johnson LV, Mullins RF, Hageman GS, Anderson DH.** The human retina and retinal pigment epithelium are abundant sources of vitronectin mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 258(3):524-9.
216. **Çerman E, Eraslan M, Çekiç O.** Age-related macular degeneration and Alzheimer disease. *Turk J Med Sci.* 2015, 45(5):1004-9.
217. **Pate GE, Walinski HP, Bohunek L, Podor TJ.** Validation of the vitronectin knockout mouse as a model for studying myocardial infarction: Vitronectin appears to influence left ventricular remodelling following myocardial infarction. *Exp Clin Cardiol.* 2013, 18(1):43-7.
218. **Tomasini-Johansson BR, Sundberg C, Lindmark G, Gailit JO, Rubin K.** Vitronectin in colorectal adenocarcinoma--synthesis by stromal cells in culture. *Exp Cell Res.* 1994, 214(1):303-12.
219. **Löhr M, Trautmann B, Göttler M, Peters S, Zauner I, Maillet B, Klöppel G.** Human ductal adenocarcinomas of the pancreas express extracellular matrix proteins. *Br J Cancer.* 1994, 69(1):144-51.
220. **Ekmekci H, Sonmez H, Ekmekci OB, Ozturk Z, Domanic N, Kokoglu E.** Plasma vitronectin levels in patients with coronary atherosclerosis are increased and correlate with extent of disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2002, 14(3):221-5.
221. **Aslan S, Ikitimur B, Cakmak HA, Karadag B, Tufekcioglu EY, Ekmekci H, Yuksel H.** Prognostic utility of serum vitronectin levels in acute myocardial infarction. *Herz.* 2015, 40(4):685-9.
222. **Aslan S, Cakmak HA, Ikitimur B, Tufekcioglu EY, Yuksel H.** The prognostic Significance of Vitronectin in Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* Aslan S, Ikitimur B, Cakmak HA, Karadag B, Tufekcioglu EY, Ekmekci H, Yuksel H, 2013, 62(18_S2):C214-C215.
223. **Pang T, Zhao Y, Zhang NR, Jin SQ, Pan SQ.** Transient limb ischemia alters serum protein expression in healthy volunteers: complement C3 and vitronectin may be involved in organ protection induced by remote ischemic preconditioning. *Oxid Med Cell Longev.* 2013, 2013:859056.
224. **Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, Knight R, Kunst G, Laing C, Nicholas J, Pepper J, Robertson S, Xenou M, Clayton T, Yellon DM und Investigators, ERICCA Trial.** Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med.* 2015, 373(15):1408-17.
225. **Tsuruta Y, Park YJ, Siegal GP, Liu G, Abraham E.** Involvement of vitronectin in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Immunol.* 2007, 179(10):7079-86.
226. **Wu MH, Ustinova E, Granger HJ.** Integrin binding to fibronectin and vitronectin maintains the barrier function of isolated porcine coronary venules. *J Physiol.* 2001, 532(Pt 3):785-91.
227. **Baez S.** An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc. Res.* 1973, 5(3):384-94.
228. **Mempel TR, Moser C, Hutter J, Kuebler WM, Krombach F.** Visualization of leukocyte transendothelial and interstitial migration using reflected light oblique transillumination in intravital video microscopy. *J Vasc Res.* 2003, 40(5):435-41.
229. **Barreiro O, Sánchez-Madrid F.** Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response. *Rev Esp Cardiol.* 2009, 62(5):552-62.

230. **Herter J, Zarbock A.** Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J Immunol.* 2013, 190(9):4451-7.
231. **McEver RP, Zhu C.** Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010, 26:363-96.
232. **van der Flier A, Sonnenberg A.** Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001, 305(3):285-98.
233. **Luo BH, Carman CV, Springer TA.** Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol.* 2007, 25:619-47.
234. **Abram CL, Lowell CA.** The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* 2009, 27:339-62.
235. **Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher E.** Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev.* 2002, 186:37-46.
236. **Chigaev A, Zwartz G, Graves SW, Dwyer DC, Tsuji H, Foutz TD, Edwards BS, Prossnitz ER, Larson RS, Sklar LA.** Alpha4beta1 integrin affinity changes govern cell adhesion. *J Biol Chem.* 2003, 278(40):38174-82.
237. **Gahmberg CG.** Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol.* 1997, 9(5):643-50.
238. **Gordon S.** Phagocytosis: The Host. JAI Press, 1999.
239. **Vaddi K, Newton RC.** Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol.* 1994, 153(10):4721-32.
240. **Kim LT, Yamada KM.** The regulation of expression of integrin receptors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997, 214(2):123-31.
241. **Springer TA, et al.** Leukocyte Adhesion Molecules: Structure, Function, and Regulation. New York, Springer. 2012.
242. **Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A.** Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood.* 2011, 118(26):6743-51.
243. **Lefort CT, Rossaint J, Moser M, Petrich BG, Zarbock A, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH, Fässler R, Ley K.** Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood.* 2012, 119(18):4275-82.
244. **Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S.** Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol.* 2010, 17(1):9-17.
245. **Weber C.** Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J Mol Med (Berl).* 2003, 81(1):4-19.
246. **Alon R, Ley K.** Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2008, 20(5):525-32.
247. **Montresor A, Toffali L, Constantin G, Laudanna C.** Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. *Front Immunol.* 2012, 25:3:127.
248. **Laudanna C.** Integrin activation under flow: a local affair. *Nat Immunol.* 2005, 6(5):429-30.
249. **Shulman Z, Shinder V, Klein E, Grabovsky V, Yeager O, Geron E, Montresor A, Bolomini-Vittori M, Feigelson SW, Kirchhausen T, Laudanna C, Shakhar G, Alon R.** Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin. *Immunity.* 2009, 30(3):384-96.
250. **Stadtmann A, Brinkhaus L, Mueller H, Rossaint J, Bolomini-Vittori M, Bergmeier W, Van Aken H, Wagner DD, Laudanna C, Ley K, Zarbock A.** Rap1a activation by CalDAG-GEFI and p38 MAPK is involved in E-selectin-dependent slow leukocyte rolling. *Eur J Immunol.* 2011, 41(7):2074-85.
251. **Lefort CT, Hyun YM, Schultz JB, Law FY, Waugh RE, Knauf PA, Kim M.** Outside-in signal transmission by conformational changes in integrin Mac-1. *J Immunol.* 2009, 183(10):6460-8.
252. **Lynch OT, Giembycz MA, Barnes PJ, Hellewell PG, Lindsay MA.** 'Outside-in' signalling mechanisms underlying CD11b/CD18-mediated NADPH oxidase activation in human adherent blood eosinophils. *Br J Pharmacol.* 1990, 128(6):1149-58.
253. **Bouaouina M, Blouin E, Halbwachs-Mecarelli L, Lesavre P, Rieu P.** TNF-induced beta2 integrin activation involves Src kinases and a redox-regulated activation of p38 MAPK. *J Immunol.* 2004, 173(2):1313-20.
254. **Heppt W, Renz H, Röcken M.** Allergologie. Berlin Heidelberg, Springer. 1998.
255. **Roy I, Evans DB, Dwinell MB.** Chemokines and chemokine receptors: update on utility and challenges for the clinician. *Surgery.* 2014, 155(6):961-73.

256. **Handel TM.** Methods in Enzymology, volume 570: Chemokines. Amsterdam u.a., Elsevier / Academic Press. 2016.
257. **Chemokines and Chemokine Receptors.** http://www.biolegend.com/chemokine_receptors. Stand: 20.01.2016.
258. **Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE.** Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009, 29(6):313-26.
259. **Horn F.** Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2012.
260. **Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH.** Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100(4):1885-90.
261. **Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P.** Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004, 25(2):75-84.
262. **Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, Wells TN.** Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry.* 1997, 36(44):13570-8.
263. **Sedlacek HH.** Immunologie - die Immunabwehr des Menschen: Schutz, Gefahren, Erkrankungen. Berlin Boston, De Gruyter. 2014.
264. **Jan MS, Huang YH, Shieh B, Teng RH, Yan YP, Lee YT, Liao KK, Li C.** CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and alpha-defensin release. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006, 41(1):6-16.
265. **Lacy P.** Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2006, 2(3):98-108.
266. **Swamydas M, Gao JL, Break TJ, Johnson MD, Jaeger M, Rodriguez CA, Lim JK, Green NM, Collar AL, Fischer BG, Lee CC, Perfect JR, Alexander BD, Kullberg BJ, Netea MG, Murphy PM, Lionakis MS.** CXCR1-mediated neutrophil degranulation and fungal killing promote Candida clearance and host survival. *Sci Transl Med.* 2016, 8(322):322ra10.
267. **Bokoch GM.** Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood.* 1995, 86(5):1649-60.
268. **Ye RD.** Regulation of nuclear factor kappaB activation by G-protein-coupled receptors. *J Leukoc Biol.* 2001, 70(6):839-48.
269. **Palomino DC, Marti LC.** Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo).* 2015, 13(3):469-73.
270. **Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT.** Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol.* 1992, 148(8):2423-8.
271. **Rollins BJ, Walz A, Baggiolini M.** Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood.* 1991, 78(4):1112-6.
272. **Haelens A, Wuyts A, Proost P, Struyf S, Opendakker G, van Damme J.** Leukocyte migration and activation by murine chemokines. *Immunobiology.* 1996, 195(4-5):499-521.
273. **Zernecke A, Weber KS, Erwig LP, Kluth DC, Schröppel B, Rees AJ, Weber C.** Combinatorial model of chemokine involvement in glomerular monocyte recruitment: role of CXC chemokine receptor 2 in infiltration during nephrotoxic nephritis. *J Immunol.* 2001, 166(9):5755-62.
274. **Reichel CA, Rehberg M, Lerchenberger M, Berberich N, Bihari P, Khandoga AG, Zahler S, Krombach F.** Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009, 29(11):1787-93.
275. **Reichel CA, Puhr-Westerheide D, Zuchtriegel G, Uhl B, Berberich N, Zahler S, Wymann MP, Luckow B, Krombach F.** C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms. *Blood.* 2012, 120(4):880-90.
276. **Vries MH, Wagenaar A, Verbruggen SE, Molin DG, Dijkgraaf I, Hackeng TH, Post MJ.** CXCL1 promotes arteriogenesis through enhanced monocyte recruitment into the peri-collateral space. *Angiogenesis.* 2015, 18(2):163-71.
277. **Smith DF, Galkina E, Ley K, Huo Y.** GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005, 289(5):H1976-84.
278. **Johnston B, Burns AR, Suematsu M, Issekutz TB, Woodman RC, Kubes P.** Chronic inflammation

upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *J Clin Invest*. 1999, 103(9):1269-76.

279. **Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, Gilman SC, Stellato C, Gladue RP, Schleimer RP, Beck LA.** Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein-1 alpha induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol*. 2000, 164(6):3392-401.

280. **Zlotnik A, Yoshie O.** The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. 2012, 36(5):705-16.

281. **Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM.** CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000, 68(1):1-8.

282. **Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Müller A, deWaal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A.** Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol*. 2000, 164(12):6621-32.

283. **Zimmerman NP, Vongsa RA, Wendt MK, Dwinell MB.** Chemokines and chemokine receptors in mucosal homeostasis at the intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008, 14(7):1000-11.

284. **Ghadjar P, Rubie C, Aebersold DM, Keilholz U.** The chemokine CCL20 and its receptor CCR6 in human malignancy with focus on colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2009, 125(4):741-5.

285. **Rice JC, Spence JS, Yetman DL, Safirstein RL.** Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney. *Ren Fail*. 2002, 24(6):703-23.

286. **Stroo I, Stokman G, Teske GJ, Raven A, Butter LM, Florquin S, Leemans JC.** Chemokine expression in renal ischemia/reperfusion injury is most profound during the reparative phase. *Int Immunol*. 2010, 22(6):433-42.

287. **Han KH, Tangirala RK, Green SR, Quehenberger O.** Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998, 18(12):1983-91.

288. **Talbot J, Bianchini FJ, Nascimento DC, Oliveira RD, Souto FO, Pinto LG, Peres RS, Silva JR, Almeida SC,**

Louzada-Junior P, Cunha TM, Cunha FQ, Alves-Filho JC. CCR2 Expression in Neutrophils Plays a Critical Role in Their Migration Into the Joints in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015, 67(7):1751-9.

289. **Qi Z, Wang X, Wei H, Sun R, Tian Z.** Infiltrating neutrophils aggravate metabolic liver failure in fah-deficient mice. *Liver Int*. 2015, 35(3):774-85.

290. **Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Cunha FQ.** Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011, 183(2):234-42.

291. **Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ.** Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990, 87(13):5134-8.

292. **Kusano KF, Nakamura K, Kusano H, Nishii N, Banba K, Ikeda T, Hashimoto K, Yamamoto M, Fujio H, Miura A, Ohta K, Morita H, Saito H, Emori T, Nakamura Y, Kusano I, Ohe T.** Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. *Circ J*. 2004, 68(7):671-6.

293. **Hayashida K, Nanki T, Girschick H, Yavuz S, Ochi T, Lipsky PE.** Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Res*. 2001, 3(2):118-26.

294. **Sanseverino I, Rinaldi AO, Purificato C, Cortese A, Millefiorini E, Gessani S, Gauzzi MC.** CCL2 induction by 1,25(OH)2D3 in dendritic cells from healthy donors and multiple sclerosis patients. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014, 144 Pt A:102-5.

295. **Sørensen TL, Ransohoff RM, Strieter RM, Sellebjerg F.** Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2004, 11(7):445-9.

296. **Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhanda R, Mummid S, Kulkarni H, Bamshad MJ, Telles V, Anderson SA, Walter EA, Stephan KT, Deucher M, Mangano A, Bologna R, Ahuja SS, Dolan MJ, Ahuja SK.** HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99(21):13795-800.

297. **Zhao L, Yang W, Yang X, Lin Y, Lv J, Dou X, Luo Q, Dong J, Chen Z, Chu Y, He R.** Chemerin suppresses

murine allergic asthma by inhibiting CCL2 production and subsequent airway recruitment of inflammatory dendritic cells. *Allergy*. 2014, 69(6):763-74.

298. **Wang A, Wang Z, Cao Y, Cheng S, Chen H, Bunjhoo H, Xie J, Wang C, Xu Y, Xiong W.** CCL2/CCR2-dependent recruitment of Th17 cells but not Tc17 cells to the lung in a murine asthma model. *Int Arch Allergy Immunol*. 2015, 166(1):52-62.

299. **Lee YG, Jeong JJ, Nyenhuis S, Berdyshev E, Chung S, Ranjan R, Karpurapu M, Deng J, Qian F, Kelly EA, Jarjour NN, Ackerman SJ, Natarajan V, Christman JW, Park GY.** Recruited alveolar macrophages, in response to airway epithelial-derived monocyte chemoattractant protein 1/CCL2, regulate airway inflammation and remodeling in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015, 52(6):772-84.

300. **Singh SR, Sutcliffe A, Kaur D, Gupta S, Desai D, Saunders R, Brightling CE.** CCL2 release by airway smooth muscle is increased in asthma and promotes fibrocyte migration. *Allergy*. 2014, 69(9):1189-97.

301. **Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K.** Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol*. 2003, 22(4):773-8.

302. **Tao LL, Shi SJ, Chen LB, Huang GC.** Expression of monocyte chemotactic protein-1/CCL2 in gastric cancer and its relationship with tumor hypoxia. *World J Gastroenterol*. 2014, 20(15):4421-7.

303. **Valković T, Lucin K, Krstulja M, Dobi-Babić R, Jonjić N.** Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer. *Pathol Res Pract*. 1998, 194(5):335-40.

304. **Rangasamy S, McGuire PG, Franco Nitta C, Monickaraj F, Oruganti SR, Das A.** Chemokine mediated monocyte trafficking into the retina: role of inflammation in alteration of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2014, 9(10):e108508.

305. **Das A, Rangasamy S, Maestas J, McGuire P.** The Chemokine Ccl2/MCP-1: A Possible Therapeutic Target in Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010, 51, 3829.

306. **Adamus G, Manczak M, Machnicki M.** Expression of CC chemokines and their receptors in the eye in autoimmune anterior uveitis associated with EAE. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001, 42(12):2894-903.

307. **Tuaillon N, Shen DF, Berger RB, Lu B, Rollins BJ, Chan CC.** MCP-1 expression in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002, 43(5):1493-8.

308. **Stroo I, Claessen N, Teske GJ, Butter LM, Florquin S, Leemans JC.** Deficiency for the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 aggravates tubular damage after renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*. 2015, 10(4):e0123203.

309. **Zaganjor E, Cobb MH.** Functions and modulation of MAP kinase pathways. *Tocris Reviews*. 2011, No. 35.

310. **Meister M, Tomasovic A, Banning A, Tikkanen R.** Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *Int J Mol Sci*. 2013, 14(3):4854-84.

311. **Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH.** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001, 22(2):153-83.

312. **Laufer S, Brune K, Gay S.** Rheumatische Erkrankungen und Entzündung: von den molekularen Grundlagen zur medikamentösen Therapie. Stuttgart New York, Thieme. 2002.

313. **Morrison DK.** MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012, 4(11).

314. **Scapin S, Leoni S, Spagnuolo S, Gnocchi D, De Vito P, Luly P, Pedersen JZ, Incerpi S.** Short-term effects of thyroid hormones during development: Focus on signal transduction. *Steroids*. 2010, 75(8-9):576-84.

315. **Kalyanaraman H, Schwappacher R, Joshua J, Zhuang S, Scott BT, Klos M, Casteel DE, Frangos JA, Dillmann W, Boss GR, Pilz RB.** Nongenomic thyroid hormone signaling occurs through a plasma membrane-localized receptor. *Sci Signal*. 2014, 7(326):ra48.

316. **Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Lehman LA, McDonald PP, Frasn SC, Billstrom MA, Henson PM, Johnson GL, Worthen GS.** Selective activation and functional significance of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils. *J Clin Invest*. 1999, 103(6):851-8.

317. **Nick JA, Avdi NJ, Young SK, McDonald PP, Billstrom MA, Henson PM, Johnson GL, Worthen GS.** An intracellular signaling pathway linking lipopolysaccharide stimulation to cellular responses of the human neutrophil: the p38 MAP kinase cascade and its functional significance. *Chest*. 1999, 116(1 Suppl):54S-55S.

318. **Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ.** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994, 265(5173):808-11.
319. **Aloy A.** Chirurgische Intensivmedizin: Kompendium für die Praxis. Wien New York, Springer 2007.
320. **Costantini V, Lenti M.** Treatment of acute occlusion of peripheral arteries. *Thromb Res*. 2002, 106(6):V285-94.
321. **Kong LL, Wang ZY, Han N, Zhuang XM, Wang ZZ, Li H, Chen NH.** Neutralization of chemokine-like factor 1, a novel C-C chemokine, protects against focal cerebral ischemia by inhibiting neutrophil infiltration via MAPK pathways in rats. *J Neuroinflammation*. 2014, 11:112.
322. **Ozacmak HS, Ozacmak VH, Barut F, Araslı M, Ucan BH.** Pretreatment with mineralocorticoid receptor blocker reduces intestinal injury induced by ischemia and reperfusion: involvement of inhibition of inflammatory response, oxidative stress, nuclear factor κ B, and inducible nitric oxide synthase. *J Surg Res*. 2014, 191(2):350-61.
323. **Singbartl K, Ley K.** Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin. *Crit Care Med*. 2000, 28(7):2507-14.
324. **François PP, Preissner KT, Herrmann M, Haugland RP, Vaudaux P, Lew DP, Krause KH.** Vitronectin interaction with glycosaminoglycans. Kinetics, structural determinants, and role in binding to endothelial cells. *J Biol Chem*. 1999, 274(53):37611-9.
325. **Thiagarajan P, Le A, Snuggs MB, VanWinkle B.** The role of carboxy-terminal glycosaminoglycan-binding domain of vitronectin in cytoskeletal organization and migration of endothelial cells. *Cell Adhes Commun*. 1996, 4(4-5):317-25.
326. **de Boer HC, Preissner KT, Bouma BN, de Groot PG.** Binding of vitronectin-thrombin-antithrombin III complex to human endothelial cells is mediated by the heparin binding site of vitronectin. *J Biol Chem*. 1992, 267(4):2264-8.
327. **Schlegel B.** Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin. Springer Berlin Heidelberg, 1982.
328. **Rossaint R, Werner C, Zwißle B.** Die Anästhesiologie: Allgemeine und spezielle Anästhesiologie, Schmerztherapie und Intensivmedizin. Springer Berlin Heidelberg New York, 2012.
329. **Swerlick RA, Brown EJ, Xu Y, Lee KH, Manos S, Lawley TJ.** Expression and modulation of the vitronectin receptor on human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*. 1992, 99(6):715-22.
330. **Zanetti A, Conforti G, Hess S, Martin-Padura I, Ghibaudi E, Preissner KT, Dejana E.** Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane. *Blood*. 1994, 84(4):1116-23.
331. **Tomanek RJ.** Assembly of the Vasculature and Its Regulation. Springer Science+Business Media New York, 2002.
332. **Harris JE, Braun DP, Anderson KM.** Prostaglandin Inhibitors in Tumor Immunology and Immunotherapy. CRC Press, 1994.
333. **Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A.** Vitronectin receptor (α (v) β 3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997, 96(6):1809-18.
334. **Laitinen I, Notni J, Pohle K, Rudelius M, Farrell E, Nekolla SG, Henriksen G, Neubauer S, Kessler H, Wester HJ, Schwaiger M.** Comparison of cyclic RGD peptides for α β 3 integrin detection in a rat model of myocardial infarction. *EJNMMI Res*. 2013, 3(1):38.
335. **Sun M, Opavsky MA, Stewart DJ, Rabinovitch M, Dawood F, Wen WH, Liu PP.** Temporal response and localization of integrins β 1 and β 3 in the heart after myocardial infarction: regulation by cytokines. *Circulation*. 2003, 107(7):1046-52.
336. **del Zoppo GJ, Mabuchi T.** Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003, 23(8):879-94.
337. **Abumiya T, Lucero J, Heo JH, Tagaya M, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ.** Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin α (v) β 3 during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999, 19(9):1038-50.
338. **Li L, Liu F, Welser-Alves JV, McCullough LD, Milner R.** Upregulation of fibronectin and the α 5 β 1 and α v β 3 integrins on blood vessels within the cerebral ischemic penumbra. *Exp Neurol*. 2012, 233(1):283-91.
339. **Høgåsen K, Mollnes TE, Harboe M.** Heparin-binding properties of vitronectin are linked to complex formation as illustrated by in vitro polymerization and binding to

the terminal complement complex. *J Biol Chem.* 1992, 267(32):23076-82.

340. **Seiffert D, Smith JW.** The cell adhesion domain in plasma vitronectin is cryptic. *J Biol Chem.* 1997, 272(21):13705-10.

341. **Zhuang P, Blackburn MN, Peterson CB.** Characterization of the denaturation and renaturation of human plasma vitronectin. I. Biophysical characterization of protein unfolding and multimerization. *J Biol Chem.* 1996, 271(24):14323-32.

342. **Kruihof EK, Nicolosa G, Bachmann F.** Plasminogen activator inhibitor 1: development of a radioimmunoassay and observations on its plasma concentration during venous occlusion and after platelet aggregation. *Blood.* 1987, 70(5):1645-53.

343. **Chintala MS, Bernardino V, Chiu PJ.** Cyclic GMP but not cyclic AMP prevents renal platelet accumulation after ischemia-reperfusion in anesthetized rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994, 271(3):1203-8.

344. **Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K.** Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood.* 1998, 92(2):507-15.

345. **Gawaz M.** Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004, 61(3):498-511.

346. **Forde RC, Fitzgerald DJ.** Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation.* 1997, 95(4):787-9.

347. **Pachel C, Mathes D, Arias-Loza AP, Heitzmann W, Nordbeck P, Deppermann C, Lorenz V, Hofmann U, Nieswandt B, Frantz S.** Inhibition of Platelet Glycoprotein VI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016, ATVB.AHA.115.305873.

348. **Gershwin ME, Vierling JM, Manns MP.** Liver Immunology: Principles and Practice. Totowa New Jersey, Humana Press. 2008.

349. **Bozic CR, Kolakowski LF Jr, Gerard NP, Garcia-Rodriguez C, von Uexkull-Guldenband C, Conklyn MJ, Breslow R, Showell HJ, Gerard C.** Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. *J Immunol.* 1995, 154(11):6048-57.

350. **Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ.** Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998, 187(4):601-8.

351. **Deng G, Curriden SA, Hu G, Czekay RP, Loskutoff DJ.** Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin. *J Cell Physiol.* 2001, 189(1):23-33.

352. **Weerasinghe D, McHugh KP, Ross FP, Brown EJ, Gisler RH, Imhof BA.** A role for the alphavbeta3 integrin in the transmigration of monocytes. *J Cell Biol.* 1998, 142(2):595-607.

353. **McNally AK, Jones JA, Macewan SR, Colton E, Anderson JM.** Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4-induced foreign body giant cell formation. *J Biomed Mater Res A.* 2008, 86(2):535-43.

354. **Paysant J, Vasse M, Soria J, Lenormand B, Pourtau J, Vannier JP, Soria C.** Regulation of the uPAR/uPA system expressed on monocytes by the deactivating cytokines, IL-4, IL-10 and IL-13: consequences on cell adhesion to vitronectin and fibrinogen. *Br J Haematol.* 1998, 100(1):45-51.

355. **Lundahl J, Sköld CM, Halldén G, Hallgren M, Eklund A.** Monocyte and neutrophil adhesion to matrix proteins is selectively enhanced in the presence of inflammatory mediators. *Scand J Immunol.* 1996, 44(2):143-9.

356. **May AE, Schmidt R, Kanse SM, Chavakis T, Stephens RW, Schömig A, Preissner KT, Neumann FJ.** Urokinase receptor surface expression regulates monocyte adhesion in acute myocardial infarction. *Blood.* 2002, 100(10):3611-7.

357. **Gotsch U, Borges E, Bosse R, Böggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D.** VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci.* 1997, 110 (Pt 5):583-8.

358. **Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, Dejana E.** Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96(17):9815-20.

359. **Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R, Muller WA, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E.** Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and

modulate endothelial permeability. *Blood*. 2001, 97(6):1679-84.

360. **Wantha S, Alard JE, Megens RT, van der Does AM, Döring Y, Drechsler M, Pham CT, Wang MW, Wang JM, Gallo RL, von Hundelshausen P, Lindbom L, Hackeng T, Weber C, Soehnlein O.** Neutrophil-derived cathelicidin promotes adhesion of classical monocytes. *Circ Res*. 2013, 112(5):792-801.

361. **Kupatt C, Wichels R, Horstkotte J, Krombach F, Habazettl H, Boekstegers P.** Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J Leukoc Biol*. 2002, 72(3):455-61.

362. **Brandt E, Petersen F, Ludwig A, Ehlert JE, Bock L, Flad HD.** The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J Leukoc Biol*. 2000, 67(4):471-8.

363. **Khandoga A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F.** Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc Res*. 2003, 65(2):71-7.

364. **Krissansen GW, Lucas CM, Stomski FC, Elliott MJ, Berndt MC, Boyd AW, Horton MA, Cheresh DA, Vadas MA, Burns GF.** Blood leukocytes bind platelet glycoprotein (IIb-IIIa)' but do not express the vitronectin receptor. *Int Immunol*. 1990, 2(3):267-77.

365. **Lam SC, Plow EF, D'Souza SE, Cheresh DA, Frelinger AL 3rd, Ginsberg MH.** Isolation and characterization of a platelet membrane protein related to the vitronectin receptor. *J Biol Chem*. 1989, 264(7):3742-9.

366. **Bennett JS, Berger BW, Billings PC.** The structure and function of platelet integrins. *J Thromb Haemost*. 2009, 7 Suppl 1:200-5.

367. **Singer II, Scott S, Kawka DW, Kazakis DM.** Adhesomes: specific granules containing receptors for laminin, C3bi/fibrinogen, fibronectin, and vitronectin in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Cell Biol*. 1989, 109(6 Pt 1):3169-82.

368. **Lawson MA, Maxfield FR.** Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature*. 1995, 377(6544):75-9.

369. **Hendey B, Lawson M, Marcantonio EE, Maxfield FR.** Intracellular calcium and calcineurin regulate neutrophil motility on vitronectin through a receptor

identified by antibodies to integrins alphav and beta3. *Blood*. 1996, 87(5):2038-48.

370. **Salanova B, Choi M, Rolle S, Wellner M, Luft FC, Kettritz R.** Beta2-integrins and acquired glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors cooperate in NF-kappaB activation of human neutrophils. *J Biol Chem*. 2007, 282(38):27960-9.

371. **Plesner T, Behrendt N, Ploug M.** Structure, function and expression on blood and bone marrow cells of the urokinase-type plasminogen activator receptor, uPAR. *Stem Cells*. 1997, 15(6):398-408.

372. **Plesner T, Ralfkiaer E, Wittrup M, Johnsen H, Pyke C, Pedersen TL, Hansen NE, Danø K.** Expression of the receptor for urokinase-type plasminogen activator in normal and neoplastic blood cells and hematopoietic tissue. *Am J Clin Pathol*. 1994, 102(6):835-41.

373. **Plesner T, Ploug M, Ellis V, Rønne E, Høyer-Hansen G, Wittrup M, Pedersen TL, Tscherning T, Danø K, Hansen NE.** The receptor for urokinase-type plasminogen activator and urokinase is translocated from two distinct intracellular compartments to the plasma membrane on stimulation of human neutrophils. *Blood*. 1994, 83(3):808-15.

374. **Simone TM, Higgins CE, Czekay RP, Law BK, Higgins SP, Archambeault J, Kutz SM, Higgins PJ.** SERPINE1: A Molecular Switch in the Proliferation-Migration Dichotomy in Wound-"Activated" Keratinocytes. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014, 3(3):281-290.

375. **Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G.** Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*. 1992, 269(3):375-82.

376. **Van Leuven F, Cassiman JJ, Van Den Berghe H.** Demonstration of an alpha2-macroglobulin receptor in human fibroblasts, absent in tumor-derived cell lines. *J Biol Chem*. 1979, 254(12):5155-60.

377. **Kaplan J, Nielsen ML.** Analysis of macrophage surface receptors. I. Binding of alpha-macroglobulin . protease complexes to rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem*. 1979, 254(15):7323-8.

378. **Munck Petersen C, Ejlersen E, Wendelboe Hansen P, Gliemann J.** Binding of alpha-2-macroglobulin trypsin complex to human monocytes in culture. *Scand J Clin Lab Invest*. 1987, 47(1):55-61.

379. **Moestrup SK, Kaltoft K, Petersen CM, Pedersen S, Gliemann J, Christensen EI.** Immunocytochemical

identification of the human alpha 2-macroglobulin receptor in monocytes and fibroblasts: monoclonal antibodies define the receptor as a monocyte differentiation antigen. *Exp Cell Res.* 1990, 190(2):195-203.

380. **Weckbach LT, Gola A, Winkelmann M, Jakob SM, Groesser L, Borgolte J, Pogoda F, Pick R, Pruenster M, Müller-Höcker J, Deindl E, Sperandio M, Walzog B.** The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via $\beta 2$ integrins (CD11/CD18). *Blood.* 2014, 123(12):1887-96.

381. **Vandevyver S, Dejager L, Vandenbroucke RE, Libert C.** An acute phase protein ready to go therapeutic for sepsis. *EMBO Mol Med.* 2014, 6(1):2-3.

382. **Herter JM, Mayadas TN.** Midkine, a middle manager of $\beta 2$ integrins. *Blood.* 2014, 123(12):1777-9.

383. **Dalli J, Norling LV, Montero-Melendez T, Federici Canova D, Lashin H, Pavlov AM, Sukhorukov GB, Hinds CJ, Perretti M.** Microparticle alpha-2-macroglobulin enhances pro-resolving responses and promotes survival in sepsis. *EMBO Mol Med.* 2014, 6(1):27-42.

384. **Degryse B, Neels JG, Czekay RP, Aertgeerts K, Kamikubo Y, Loskutoff DJ.** The low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem.* 2004, 279(21):22595-604.

385. **Kamikubo Y, Neels JG, Degryse B.** Vitronectin inhibits plasminogen activator inhibitor-1-induced signalling and chemotaxis by blocking plasminogen activator inhibitor-1 binding to the low-density lipoprotein receptor-related protein. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009, 41(3):578-85.

386. **Willnow TE, Nykjaer A, Herz J.** Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol.* 1999, 1(6):E157-62.

387. **Cao C, Lawrence DA, Li Y, Von Arnim CA, Herz J, Su EJ, Makarova A, Hyman BT, Strickland DK, Zhang L.** Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. *EMBO J.* 2006, 25(9):1860-70.

388. **Spijkers PP, da Costa Martins P, Westein E, Gahmberg CG, Zwaginga JJ, Lenting PJ.** LDL-receptor-related protein regulates beta2-integrin-mediated leukocyte adhesion. *Blood.* 2005, 105(1):170-7.

389. **Ranganathan S, Cao C, Catania J, Migliorini M, Zhang L, Strickland DK.** Molecular basis for the

interaction of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) with integrin alphaMbeta2: identification of binding sites within alphaMbeta2 for LRP1. *J Biol Chem.* 2011, 286(35):30535-41.

390. **Lee D, Walsh JD, Migliorini M, Yu P, Cai T, Schwieters CD, Krueger S, Strickland DK, Wang YX.** The structure of receptor-associated protein (RAP). *Protein Sci.* 2007, 16(8):1628-40.

391. **Gettins PG, Dolmer K.** The High Affinity Binding Site on Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) for the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP1) Is Composed of Four Basic Residues. *J Biol Chem.* 2016, 291(2):800-12.

392. **Simone TM, Higgins PJ.** Low Molecular Weight Antagonists of Plasminogen Activator Inhibitor-1: Therapeutic Potential in Cardiovascular Disease. *Mol Med Ther.* 2012, 1(1):101.

393. **Charo IF, Ransohoff RM.** The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006, 354(6):610-21.

394. **Daly C, Rollins BJ.** Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation.* 2003, 10(3-4):247-57.

395. **Viola A, Luster AD.** Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008, 48:171-97.

396. **Mahad DJ, Ransohoff RM.** The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol.* 2003, 15(1):23-32.

397. **Mercer PF, Williams AE, Scotton CJ, José RJ, Sulikowski M, Moffatt JD, Murray LA, Chambers RC.** Proteinase-activated receptor-1, CCL2, and CCL7 regulate acute neutrophilic lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014, 50(1):144-57.

398. **Reichel CA, Khandoga A, Anders HJ, Schlöndorff D, Luckow B, Krombach F.** Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue. *J Leukoc Biol.* 2006, 79(1):114-22.

399. **Cambien B, Pomeranz M, Millet MA, Rossi B, Schmid-Alliana A.** Signal transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration. *Blood.* 2001, 97(2):359-66.

400. **Wan Y, Kurosaki T, Huang XY.** Tyrosine kinases in activation of the MAP kinase cascade by G-protein-coupled receptors. *Nature*. 1996, 380(6574):541-4.
401. **Wan Y, Bence K, Hata A, Kurosaki T, Veillette A, Huang XY.** Genetic evidence for a tyrosine kinase cascade preceding the mitogen-activated protein kinase cascade in vertebrate G protein signaling. *J Biol Chem*. 1997, 272(27):17209-15.
402. **Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ.** Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1999, 11(2):177-83.
403. **Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ.** Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem*. 1997, 272(7):4637-44.
404. **Yen H, Zhang Y, Penfold S, Rollins BJ.** MCP-1-mediated chemotaxis requires activation of non-overlapping signal transduction pathways. *J Leukoc Biol*. 1997, 61(4):529-32.
405. **Ayala JM, Goyal S, Liverton NJ, Claremon DA, O'Keefe SJ, Hanlon WA.** Serum-induced monocyte differentiation and monocyte chemotaxis are regulated by the p38 MAP kinase signal transduction pathway. *J Leukoc Biol*. 2000, 67(6):869-75.
406. **Ashida N, Arai H, Yamasaki M, Kita T.** Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *J Biol Chem*. 2001, 276(19):16555-60.
407. **Chen LW, Lin MW, Hsu CM.** Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *J Biomed Sci*. 2005, 12(2):311-9.
408. **Xu N, Hossain M, Liu L.** Pharmacological inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases affects KC/CXCL1-induced intraluminal crawling, transendothelial migration, and chemotaxis of neutrophils in vivo. *Mediators Inflamm*. 2013, 2013:290565.
409. **Ren DL, Sun AA, Li YJ, Chen M, Ge SC, Hu B.** Exogenous melatonin inhibits neutrophil migration through suppression of ERK activation. *J Endocrinol*. 2015, 227(1):49-60.
410. **Nick JA, Avdi NJ, Young SK, Knall C, Gerwins P, Johnson GL, Worthen GS.** Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and FMLP. *J Clin Invest*. 1997, 99(5):975-86.
411. **Bullone M, Moran K, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP.** PI3K and MAPKs regulate neutrophil migration toward the airways in heaves. *J Vet Intern Med*. 2013, 27(1):164-70.
412. **Cara DC, Kaur J, Forster M, McCafferty DM, Kubes P.** Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration and chemotaxis in vivo. *J Immunol*. 2001, 167(11):6552-8.
413. **Heit B, Tavener S, Raharjo E, Kubes P.** An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol*. 2002, 159(1):91-102.
414. **Zu YL, Qi J, Gilchrist A, Fernandez GA, Vazquez-Abad D, Kreutzer DL, Huang CK, Sha'afi RI.** p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for human neutrophil function triggered by TNF-alpha or FMLP stimulation. *J Immunol*. 1998, 160(4):1982-9.
415. **Li LF, Yu L, Quinn DA.** Ventilation-induced neutrophil infiltration depends on c-Jun N-terminal kinase. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004, 169(4):518-24.

11 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen und mich in dieser Zeit unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl bedanke ich mich für die Aufnahme an das Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin.

Herrn PD Dr. med. Christoph Reichel danke ich besonders für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe meiner Projektarbeit und die hervorragende Betreuung. Seine wissenschaftliche Neugier und fachliche Kompetenz haben wesentlich zum erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit beigetragen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Fritz Krombach, der stets ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte und in schwierigen Situationen mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand. Neben seiner fachlichen Expertise schätze ich Herrn Prof. Dr. Fritz Krombach vor allem persönlich sehr.

Dr. rer. nat. Gabriele Zuchtriegel danke ich in besonderem Maße für die Einführung in sämtliche wissenschaftliche Methoden der Arbeitsgruppe und die hervorragende Mitbetreuung meiner Doktorarbeit durch gute Ratschläge, Hilfestellungen und konstruktive Diskussionen.

Bei allen Mitarbeitern im Labor und dem gesamten Team unserer Arbeitsgruppe, Dr. med. Bernd Uhl, Matthias Fabritius, Daniel Puhr-Westerheide, Kariem Sharaf, Stefanie Hirn, Gerhard Adams, Claudia Fahney, Katharina Nekolla, Sabine Sellner, bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsklima und für viele nette Gespräche.

Den Mitarbeitern der Tierhaltung am Walter-Brendel-Zentrum danke ich für die Pflege und Versorgung der Versuchstiere.

Ebenso danke ich dem Vorstand des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der medizinischen Fakultät der LMU für die Aufnahme in das Förderprogramm und die finanzielle Unterstützung. Die vielen interessanten Vorträge und Seminare haben meinen Wissensstand auf dem Gebiet der medizinischen Forschung wesentlich bereichert.

Bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern und meinem Mann, bedanke ich mich von ganzem Herzen für ihre Unterstützung.